



Etude des mécanismes de résistance du moustique *Aedes aegypti* aux insecticides pyréthrinoïdes : Apports des nouvelles technologies de séquençage ADN à l'identification de nouveaux marqueurs de résistance.

Frederic Faucon

► To cite this version:

Frederic Faucon. Etude des mécanismes de résistance du moustique *Aedes aegypti* aux insecticides pyréthrinoïdes : Apports des nouvelles technologies de séquençage ADN à l'identification de nouveaux marqueurs de résistance.. *Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]*. Université Grenoble Alpes, 2015. Français. NNT : 2015GREAV027 . tel-01321595

HAL Id: tel-01321595

<https://theses.hal.science/tel-01321595>

Submitted on 26 May 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Biodiversité, Ecologie, Environnement**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Frédéric FAUCON

Thèse co-dirigée par

M. Jean-Philippe DAVID et **M. Stéphane REYNAUD**

préparée au sein du **Laboratoire d'Ecologie Alpine**
dans l'**École Doctorale Chimie et Science du Vivant**

**Etude des mécanismes de résistance du moustique
Aedes aegypti aux insecticides pyréthrinoïdes :
apports des nouvelles technologies de séquençage
ADN à l'identification de nouveaux marqueurs de
résistance.**

Thèse soutenue publiquement le **14 Décembre 2015**

devant le jury composé de :

Mme Claire VALIENTE-MORO

Maître de conférences à l'Université Claude Bernard Lyon 1
(Rapporteur)

M. Frédéric SIMARD

Directeur de recherche à IRD-MIVEGEC, (Rapporteur)

M. Vincent CORBEL

Directeur de recherche à l'IRD-MIVEGEC, (Examineur)

M. Jean Philippe DAVID

Chargé de recherche CNRS (Directeur de thèse)

M. Stéphane REYNAUD

Maître de conférences à l'Université Grenoble Alpes (Directeur de thèse)

M. Pierre TABERLET

Directeur de recherche CNRS (**Président du jury**)



Dédicace

A ma famille et mes amis,
pour leur présence et leur soutien.

Remerciements

Dès mon arrivée au Laboratoire d'Ecologie Alpine lors de mon stage de M1, j'ai fait de nombreuses rencontres. Autant de personnes qui m'ont accueilli, aidé, soutenu, et que j'aimerais remercier aujourd'hui.

Stéphane REYNAUD et **Jean-Philippe DAVID**, un couple d'encadrants qui fonctionne depuis le tout début. Merci de m'avoir fait confiance ce jour d'entretien de stage de M1, j'ai vraiment apprécié toutes ces années à travailler sous votre direction. La liberté d'action que vous m'avez laissé durant cette thèse et les échanges réguliers m'ont permis d'acquérir une bonne maturité, une bonne autonomie ainsi qu'un esprit critique, autant d'atouts qui me seront utiles dans la vie. Vous êtes d'ailleurs plus que de simples « chefs » et avez toujours été à l'écoute et soucieux de mon bien-être, merci pour tout !

Je tiens à remercier sincèrement les rapporteurs **Claire VALIENTE-MORO** et **Frédéric SIMARD**, mais également les examinateurs **Vincent CORBEL** et **Pierre TABERLET** d'avoir accepté d'évaluer mon travail ! Sans votre participation ce travail n'aurait pas la même portée.

Un grand merci par ailleurs à **Vincent NAVRATIL** et **Frédéric BOYER** pour votre aide précieuse dans le traitement des données de séquençage ainsi que votre participation à mes comités de thèse ! Sans oublier **Laurence DESPRES**, **Fabrice CHANDRE** et **Pierrick LABBE**, également membres de ce comité de thèse, et qui m'ont apporté leur vision et leurs compétences scientifiques. Un grand merci également à **Florian ALBERTO** et **Pierre De VILLEMEREUIL** pour leur aide moins officielle mais tellement précieuse !

Il convient également de remercier l'Ecole Doctorale Chimie et Science du Vivant, dirigée par **Christelle BRETON**, ainsi que le jury ayant appuyé ma candidature et permis l'obtention de l'allocation ministérielle me permettant de réaliser cette thèse. Merci également à **Magali POURTIER**, secrétaire de l'EDCSV, pour sa réactivité et sa disponibilité.

Cette thèse a été rythmée en partie par l'enseignement, rendu possible par des personnes qui m'ont fait confiance comme **Gabrielle TICHTINSKY**, **Stéphane BEC** et **Sophie SRODA**. Merci à vous de m'avoir permis cet accès à la pédagogie qui ressort comme un point fort de mon projet professionnel.

Enfin tant de collègues et amis à remercier, qui ont tous contribué à faire de ces 3 ans un moment fort et inoubliable de ma vie. Tout d'abord **Muhammad Asam RIAZ**, mon premier maître de stage, une force tranquille de la Nature qui a contribué à me donner goût à la recherche! Merci à **Mathieu FAURE**, **Guillaume TETREAU** et **Angélique SAN-MIGUEL**, une équipe d'accueil au top ! Merci pour ces fous rires, ces missions dans les tréfonds du LECA et cette bonne humeur ! Merci également à **Michel TISSUT**, un puit d'histoires et de connaissances avec qui j'ai pu avoir de longues conversations très enrichissantes ! Merci également à **Sophie PERIGON** pour ton aide au labo mais aussi pour ces moments partagés à l'escalade, et à **Frédéric LAPORTE** pour son aide précieuse en qPCR. **Christian MIQUEL**, l'homme de tous les fronts, merci pour ton aide précieuse sur le plateau MARMOL mais aussi pour ta contribution envers la capture d'abeilles !

Un merci tout particulier à **Alexia CHANDOR-PROUST**, pour sa bonne humeur communicative, et pour tout ce que j'ai pu apprendre grâce à elle. Encore merci Ô grande prêtresse de la biochimie des levures ! J'espère de tout cœur que ton entreprise va se pérenniser !! Enfin mes pensées les plus reconnaissantes vont à **Thierry GAUDE**, la polyvalence incarnée, qui m'a apporté une aide technique précieuse lors de cette thèse mais qui est également devenu un ami sincère. De nombreux échanges autour du bricolage, du jardinage et des champignons, que de bons moments ! Et une chose que je retiendrais : trois fois coupé, trois fois trop court...toi non plus tu ne me manqueras pas !

Plus exotique mais tout aussi inoubliables, **Vincent CORBEL**, **Cécile BRENGUES**, **Stéphane DUCHON**, **Waraporn JUNTARAJUMMONG**, **Bénédicte FUSTEC**, **Victor CHAUMEAU**, et **Patchawaran SIRISOPA** de m'avoir si chaleureusement accueilli et accompagné en Thaïlande. A l'autre bout du monde, je n'oublie pas **Isabelle DUSFOUR**, **Romain GIROD**, **Romuald CARINCI**, **Jean ISSALY**, **Pascal GABORIT**, **Amandine GUIDEZ**, **Lisa**, **Sandra**, **Léo**, **Edouard** et toute la bande qui m'ont également accueilli comme si l'on se connaissait depuis toujours et m'ont fait découvrir cette fabuleuse région qu'est la Guyane. Ces échanges scientifiques et culturels ont été pour moi une réelle source de maturité et d'épanouissement. Vous n'imaginez probablement pas à quel point vous avez contribué à mon évolution personnelle par vos connaissances, vos caractères et tous ces moments inoubliables en votre compagnie

Un pensée particulière pour **Doudou**, **Doudounette**, **Renaud**, **Lionel**, **Rémi** et **Fantine** : une stagiaire d'enfer, un partenaire de voyage et d'évasion en or, un pote de master

et d'apiculture avec qui l'aventure continue, un ami avec qui on partagera sûrement un futur proche, une machine à compter les larves qui cache une personne au grand cœur et qui m'a accueilli et soutenu dans des passages difficiles et enfin un coloc' qui nécessiterait une biographie plus longue que cette thèse pour être décrit (bieng sure, c'est pas 17 heures mais peuchère ! Apérooo avé les tantines \m/). D'ailleurs en parlant de coloc', **Damien**, sous espèce du genre physicien dont le plat favoris est le bi-choco, sans aucun doute un gars en or. Merci de ta gentillesse et de ta patience envers toutes mes conneries débiles et envahissantes !

La « Celkorale », dénommé ainsi par mon très cher **Idir**, à la fois scientifique et bassiste fou, dont l'énergie perpétuelle se transmet de générations en générations ! Une belle bande d'abrutis mais par-dessus tout d'amis sincères qui ont été de tous les instants, les plus fous comme les plus forts. Merci à **Florian** pour son chant mongole qui cache un mec génial et à l'écoute, à **Geoffrey** (pas facile à écrire non plus ^^) le cousin le plus déjanté (bien sur frièrree, c'est la famiille) sur qui on peut toujours compter (sauf pour la fête du roi de l'oiseau...) et à **Tristan**, qui vit dans un monde parallèle fait de musique et de blondinettes, mais qui est très vite devenu un ami sincère et a tant de fois été là pour moi dans les moments difficiles.

Et on garde le meilleur pour la fin, les personnes sans qui je ne serais pas ce que je suis et sans qui je n'aurais jamais fait cette thèse : mes **parents** et **grands-parents**, qui m'ont mis le virus de la Nature, m'ont appris tant de choses et sont à l'origine de mes traits de caractère. Ces personnes sont des modèles pour moi, d'une force et d'une simplicité dont beaucoup devraient s'inspirer. Mon petit frère **Thibaud**, qui a pu être insupportable dans son plus jeune âge mais qui se révèle en jeune homme avec un grand cœur et des qualités immenses : tu me charrie parce que maintenant je suis chercheur...d'emploi, et tu as bien raison car c'est toi qui a tout compris et qui a pris la bonne voie ! Malgré tout ce qui a pu se passer, je ne t'oublie pas **Marion**. Tu as été là pour moi et tu m'as encouragé pendant toutes ces années, je te remercie du fond du cœur. Enfin **Mélanie**, si peu probable que ton nom soit là et pourtant maintenant tellement évident. Merci d'être qui tu es, d'avoir croisé mon chemin, et de m'avoir soutenu comme tu l'as fait <3 !

Avant-propos

Cette thèse sur article déposée à l'Ecole Doctorale Chimie et Sciences du Vivant (EDCSV) de l'Université Joseph Fourier (UJF) résume le travail réalisé au Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) depuis Octobre 2012.

Ces trois années de thèse ont été financées par une allocation de recherche couplée à un contrat de moniteur obtenu dans le cadre du Label Recherche et Enseignement Supérieur (RES). Les expérimentations ont été financées par le projet CNRS INEE APEGE 2013 « Mosquit-Target » (13 000 euros), le projet ISERM IMMI 2014 « Entomo-chik » (19 800 euros), un financement interne LECA (10 000 euros), le projet Européen FP7 AvecNet (consommables) et le projet Beesy 2012 (4000 euros). Ce travail a donné lieu à la rédaction de 6 articles (5 publiés et 1 en préparation), à 3 communications orales en congrès, un stage de formation en bio-informatique à l'EMBL-EBI (Hinxton, UK) et à l'encadrement d'une stagiaire (étudiante en M1 Biodiversité Ecologie Environnement de Grenoble). J'ai également réalisé des campagnes d'échantillonnage sur le terrain et de transfert de connaissances en Thaïlande dans le cadre d'une collaboration avec l'IRD (financé par le PHC SIAM) et en Guyane Française avec l'Institut Pasteur (financé par une bourse voyage OSUG). Cette thèse m'aura enfin permis de découvrir et d'apprécier l'enseignement dans le supérieur comme dans le primaire, facette maintenant indissociable de mon projet professionnel.



Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des figures.....	2
Liste des tableaux	4
Chapitre I : Introduction et état de l'art.....	5
I. Des moustiques et des Hommes	5
Histoire évolutive et biologie du moustique	5
Les moustiques, vecteurs de pathogènes.....	7
La lutte contre les moustiques	8
<i>Les insecticides chimiques</i>	8
<i>Les alternatives de bio-contrôle</i>	14
II. La résistance aux insecticides : une histoire de sélection	16
Adaptation et résistance des moustiques aux insecticides	16
<i>Résistance comportementale</i>	18
<i>Résistance cuticulaire et séquestration</i>	18
<i>Résistance par mutation de la cible</i>	18
<i>Résistance métabolique</i>	20
Enzymes de détoxification et bases moléculaires de la résistance métabolique.....	23
<i>Surproduction des enzymes de détoxification</i>	23
<i>Modifications qualitatives</i>	24
<i>Les enzymes de détoxification impliquées dans la résistance aux insecticides</i>	25
<i>Mécanismes de sur-expression des gènes de détoxification</i>	28
Complexité des mécanismes de résistance.....	29
III. L'étude de la résistance aux insecticides au gré des progrès technologiques ...	31
L'ère pré-biologie moléculaire.....	31

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	31
« Quantitative trait <i>loci</i> » (QTL)	32
Le séquençage des génomes, une étape clé dans la recherche sur les vecteurs	33
Puce à ADN (« DNA microarray »).....	34
Séquençages à haut débit (Next-generation sequencing « NGS »).....	35
IV. Objectifs de la thèse	39
Contexte d'étude	39
Modèle biologique et insecticides étudiés.....	42
Chapitre II: Apports et limites du séquençage ARN haut débit (RNA-seq) pour l'étude de la résistance aux insecticides.....	45
I. Contexte scientifique	45
II. Objectifs de l'étude et approches utilisées	45
III. Discussion des principaux résultats	48
Apports et limites de l'outil RNA-seq.....	48
Les gènes candidats à la résistance.....	49
<i>Profils généraux</i>	49
<i>Sur-expression des gènes de détoxification</i>	50
<i>Variations de polymorphisme au sein des gènes de détoxification</i>	51
Conclusions	51
Publication I :	54
Chapitre III: Etude des bases génomiques de la résistance au pyréthrinoloïde deltaméthrine par enrichissement génomique et séquençage haut débit (DNA-seq).	78
I. Contexte scientifique	78
II. Objectifs de l'étude et approches utilisées	79
III. Discussion des principaux résultats	83
Le DNA-seq ciblé pour l'identification de nouveaux marqueurs de résistance.....	83

Marqueurs génomiques de la résistance	84
<i>Amplifications géniques</i>	84
<i>Variations de polymorphisme</i>	85
Conclusion.....	86
Publication II :	88
Chapitre IV: Etude des bases moléculaires de la résistance aux pyréthrinoïdes par combinaison des techniques de RNA-seq et DNA-seq.....	118
I. Contexte et approches utilisées	118
II. Matériel et Méthodes	120
Matériel biologique et séquençage	120
Traitement des séquences	120
Analyse des données d'expression	121
Analyse des données de polymorphisme	121
Méthode de détection de l'expression d'allèles spécifiques	122
III. Résultats	122
Expression différentielle et gènes candidats	123
Variations de polymorphisme et gènes candidats	126
Expression d'allèles spécifiques (Allele Specific Expression)	130
Rôle des amplifications géniques dans la sur-expression des enzymes de détoxification	132
Modifications cis-promotrices et expression des gènes de détoxification.....	134
IV. Discussion	136
Combiner RNA-seq et DNA-seq pour étudier la résistance des moustiques aux insecticides	136
Catégories fonctionnelles affectées par la sélection et gènes candidats.....	136
Modification génomiques entraînant la sur-expression	138
Conclusion.....	139

Chapitre V : Discussion et perspectives.....	140
I. Le contexte en bref	140
II. Bilan de la thèse	141
Le séquençage Haut-débit pour l'étude des mécanismes de résistance des moustiques aux insecticides	141
Marqueurs génomiques de la résistance.....	142
<i>Résistance métabolique à la deltaméthrine</i>	142
<i>Mécanismes de régulation de l'expression des gènes candidats</i>	144
<i>Pertinence des mutations Kdr comme marqueurs de la résistance à la deltaméthrine</i>	146
Limites des études	147
<i>Phénotype de résistance croisée/multiple</i>	147
<i>Annotation des génomes</i>	148
Tri des candidats par association génotype-phénotype (génétique quantitative).....	150
Validation fonctionnelle.....	151
<i>Expression en système hétérologue et caractérisation des interactions enzymes-insecticides</i>	151
<i>Interférence ARN</i>	152
<i>Modélisation in silico</i>	154
<i>Modifications de l'ADN : le système CRISPR-Cas9</i>	155
Références citées	162
Annexe I : UV light and urban pollution : bad cocktail for mosquitoes?	180
Annexe II : Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A	192
Annexe III : Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in <i>Aedes aegypti</i> mosquito.....	204

Liste des abréviations

OC(s) : organochloré(s), famille de produit phytosanitaire

OPs(s) : organophosphoré(s), famille de produit phytosanitaire

Carb(s) : carbamate(s), famille de produit phytosanitaire

PYR(s) : pyréthrianoïde(s), famille de produit phytosanitaire

ULV : « ultra low volume », technique de pulvérisation à ultra bas volume

IRS : « indoor residual spraying », pulvérisation intra-domiciliaire

ITN(s) : « insecticide treated net(s) », moustiquaire(s) imprégnée(s) d'insecticide(s)

LLIN(s) : “long lasting insecticidal net(s)”, moustiquaire(s) imprégnée(s) d'insecticide(s) à efficacité prolongée

Bti : *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, bio-insecticide

GABA : “Gamma-AminoButyricAcid”, neuro-transmetteur

Kdr : “knockdown resistance”, mutation de la cible des PYRs

CYP(s) : mono-oxygénase(s) à cytochrome P450

CCE(s) : carbocxy/choline estérase(s)

GST(s) : glutathion-S-transférase(s)

UDPGT(s) : Uridine DiPhosphate Glucosyltransferase(s)

SAGE : “serial analysis of gene expression”, méthode de simplification du transcriptome

RPKM : “Reads Per Kilobase of transcripts per Million reads in the library”, méthode de normalisation de l'expression en RNA-seq

CNV : “copy number variation”, augmentation du nombre de copies d'un gène traduisant une amplification génique

ASE : « allele specific expression », expression d'un allèle spécifique, induisant des fréquences alléliques issues du RNA-seq et du DNaseq différentes

Liste des figures

Figure 1: Cycle de vie du moustique <i>Aedes aegypti</i>	6
Figure 2 : Diversité des gîtes larvaires	7
Figure 3: Cibles biochimiques des insecticides chimiques de synthèse.....	11
Figure 4 : Dispositifs insecticides pour l'utilisation des insecticides pyréthrinoides en lutte anti-vectorielle.....	13
Figure 5: Evolution de la résistance des insectes aux insecticides.....	16
Figure 6: Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques chez le moustique	17
Figure 7 : Processus de détoxification d'un composé xénobiotique.....	21
Figure 8: Cytochrome P450.	22
Figure 9: Réaction d'hydrolyse catalysée par les carboxylestérases.....	22
Figure 10: Glutathion-S-transférases	23
Figure 11 : Principe général du fonctionnement des puces à ADN d'expression.....	35
Figure 12: Principe de la technique de séquençage à haut débit Illumina.	37
Figure 13 : Objectifs de la thèse et inter-connexions entre les différents chapitres.....	41
Figure 14: Organigramme de l'étude aboutissant à la Publication I.	46
Figure 15: Schéma du principe de quantification de l'expression d'un transcrit par RNA-seq.	47
Figure 16: Schéma du principe de détection des variations de polymorphisme.	47
Figure 17: Schéma des différentes étapes d'une étude par DNA-seq ciblé par la technologie SureSelect®.....	80
Figure 18: Catégories fonctionnelles des gènes capturés dans la Publication II. Le nombre de gènes capturé pour chaque catégorie est indiqué entre parenthèses.....	81
Figure 19: Organigramme de l'étude aboutissant à la Publication II.....	82
Figure 20: Expression différentielle des gènes détectés.....	124
Figure 21 : Profil de transcription des gènes codant pour des enzymes de détoxification en lien avec la résistance à la deltaméthrine.	125
Figure 22: Empreinte de sélection à l'échelle du transcriptome.	127
Figure 23 : Catégories fonctionnelles associées aux gènes affectés par des variations de polymorphisme en lien avec la résistance à la deltaméthrine	128
Figure 24 : Variations différentielles non-synonymes affectant des gènes potentiellement impliqués dans la résistance à la deltaméthrine.....	129

Figure 25: Distribution des coefficients de corrélation moyens par gène des fréquences alléliques obtenues par RNA-seq avec celles obtenues par DNA-seq	131
Figure 26: Distribution des coefficients de corrélation moyens sur les gènes potentiellement affectés par des évènements d'expression d'allèles spécifiques.	131
Figure 27: Focus sur l'expression d'allèles spécifiques portant sur le gène CYP304B3.....	132
Figure 28: Lien entre augmentation du nombre de copies et sur-expression des gènes candidats.....	133
Figure 29: Association entre la fréquence des variations de polymorphisme de la région <i>cis</i> -régulatrice des gènes <i>CYP9J26</i> et <i>AAEL014891</i> et le niveau d'expression de ces gènes (RPKM).....	134
Figure 30: Eléments de régulation des gènes <i>CYP6J26</i> <i>AAEL014891</i>	135
Figure 31: Schéma de principe de la recombinaison génétique par rétro-croisements.....	150
Figure 32: Spectres CO (monoxyde de carbone) d'absorption des P450 CYP6P4, CYP6P5 et CYP6M11.....	152
Figure 33 : Principe de l'interférence ARN	153
Figure 34: Résultats de l'inhibition de l'expression des gènes CCEAE3A, CCEAE4A, CCEAE6A, CYP6BB2 et CYP6CC1 après injection d'ARN double brin.....	154
Figure 35: Le système CRISPR-Cas9 pour l'étude de la résistance des moustiques aux insecticides et leur potentiel futur en tant que moyen de bio-contrôle.....	156
Figure 36: Outils de diagnostic de la résistance: quelques pistes potentielles.	158
Figure 37: Schéma de synthèse décrivant les mécanismes génétiques à l'origine de la résistance des moustiques aux insecticides.	161

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales maladies transmises par les moustiques.	8
Tableau 2 : Principales familles d'insecticides chimiques.	9
Tableau 3: Cytochromes P450 de moustiques dont le rôle dans la résistance aux insecticides a été validé.	26
Tableau 4: Récapitulatif des populations de moustique utilisées dans cette thèse.	43
Tableau 5: Statistiques de séquençage et d'alignement des séquences obtenues.	123
Tableau 6 : Statistiques de détection des variations de polymorphismes obtenues à partir des données de RNAseq.	126
Tableau 7 : Récapitulatif des meilleurs candidats issus de la thèse.	143

Chapitre I :

Introduction et état de l'art

I. Des moustiques et des Hommes

Histoire évolutive et biologie du moustique

Dans l'histoire de l'évolution des espèces, les **moustiques**, ou *Culicidae*, seraient apparus il y a plus de 180 Ma, au cours du Jurassique inférieur (Borkent et Grimaldi 2004). Aujourd'hui, près de 3500 espèces sont réparties dans le monde entier, des régions tropicales aux pôles arctiques, en passant par les déserts et les zones tempérées (Harbach 2007). Vraisemblablement, il pourrait y avoir 3 à 5 fois plus d'espèces de moustiques à découvrir dans la nature ou au sein de complexes d'espèces inconnus. Les trois genres majoritaires regroupant la plupart des espèces connues à ce jour sont les genres *Anopheles*, *Aedes* et *Culex*.

Ces insectes de l'ordre des diptères possèdent une phase de développement aquatique composée de 4 stades larvaires et d'un stade nymphal, et une phase aérienne correspondant au stade adulte. Après l'accouplement, la femelle moustique doit effectuer un **repas sanguin** sur un hôte animal afin d'obtenir un apport protéique, essentiel pour la maturation de ses œufs. La ponte des œufs est effectuée ensuite dans le milieu aquatique afin de permettre l'éclosion des larves. Selon le genre et/ou l'espèce de moustique, la ponte des œufs diffère (Clements 1992). Les femelles du genre *Culex* pondent leurs œufs à la surface de l'eau sous forme de radeaux, tandis que les femelles du genre *Anopheles* les pondent individuellement. Pour ces deux genres, l'éclosion se produira de 1 à 3 jours après la ponte. Pour la majorité des espèces du genre *Aedes*, les femelles gravides déposent leurs œufs sur un substrat humide à l'interface entre l'air et l'eau (**Figure 1**). Ces œufs étant disposés au-dessus du niveau de l'eau, l'éclosion se produira à la suite d'une montée des eaux dans le gîte. Les œufs peuvent alors résister plusieurs mois à la dessiccation en cas de sécheresse. Après éclosion, quatre stades larvaires se succéderont pendant une durée variant de 5 jours à deux semaines en fonction de l'espèce considérée, de la température et de la quantité de nourriture disponible. Le stade nymphal succède au 4^{ème} stade larvaire, pour une durée de 48 à 72 heures avant d'aboutir à l'émergence du moustique adulte.

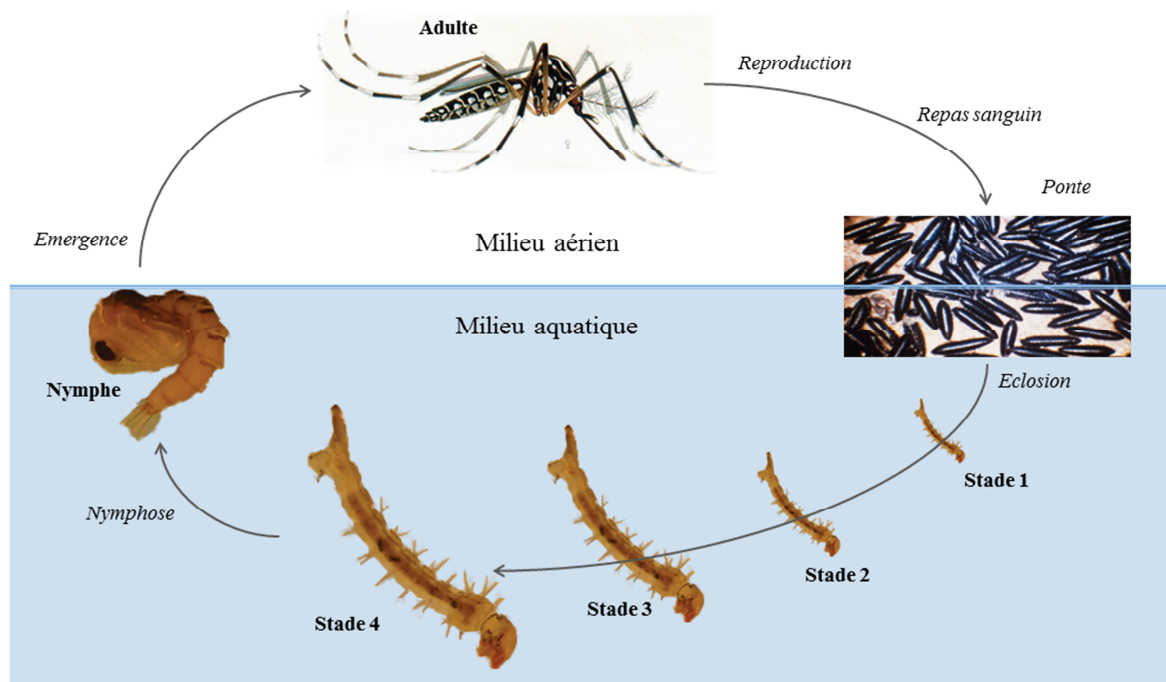


Figure 1: Cycle de vie du moustique *Aedes aegypti*

Le cycle de vie des espèces tropicales est très rapide, variant de deux semaines à un mois environ tout au long de l'année grâce au climat tropical. Leurs niches écologiques peuvent être très variées et les différentes espèces auront ainsi des **spécificités d'habitats**, de gîtes larvaires (**Figure 2**) ainsi que d'hôtes pour le repas sanguin.

C. quinquefasciatus colonise par exemple des gîtes larvaires pouvant être très pollués comme des égouts (Figure 2a.) alors que les larves d'*An. gambiae* se développeront dans des flaques ou des fosses inondées de milieux ruraux (marécages, rizières) ou forestiers pouvant être également riches en matière organique mais moins polluées (Figure 2e.). *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* préféreront les petits gîtes avec une eau claire faiblement chargée en matière organique, en zone périurbaine par exemple pour *Ae. albopictus* (creux d'arbres, coquilles de fruits ; Figure 2b.) ou en zone fortement urbanisée pour *Ae. aegypti* (récipients de récupération d'eau de pluies, pneus en décharge ; **Figure 2c.** et **Figure 2d.**).

Ces quatre espèces sont dites **anthropophiles** et se dirigeront préférentiellement sur un hôte humain pour leur repas sanguin.

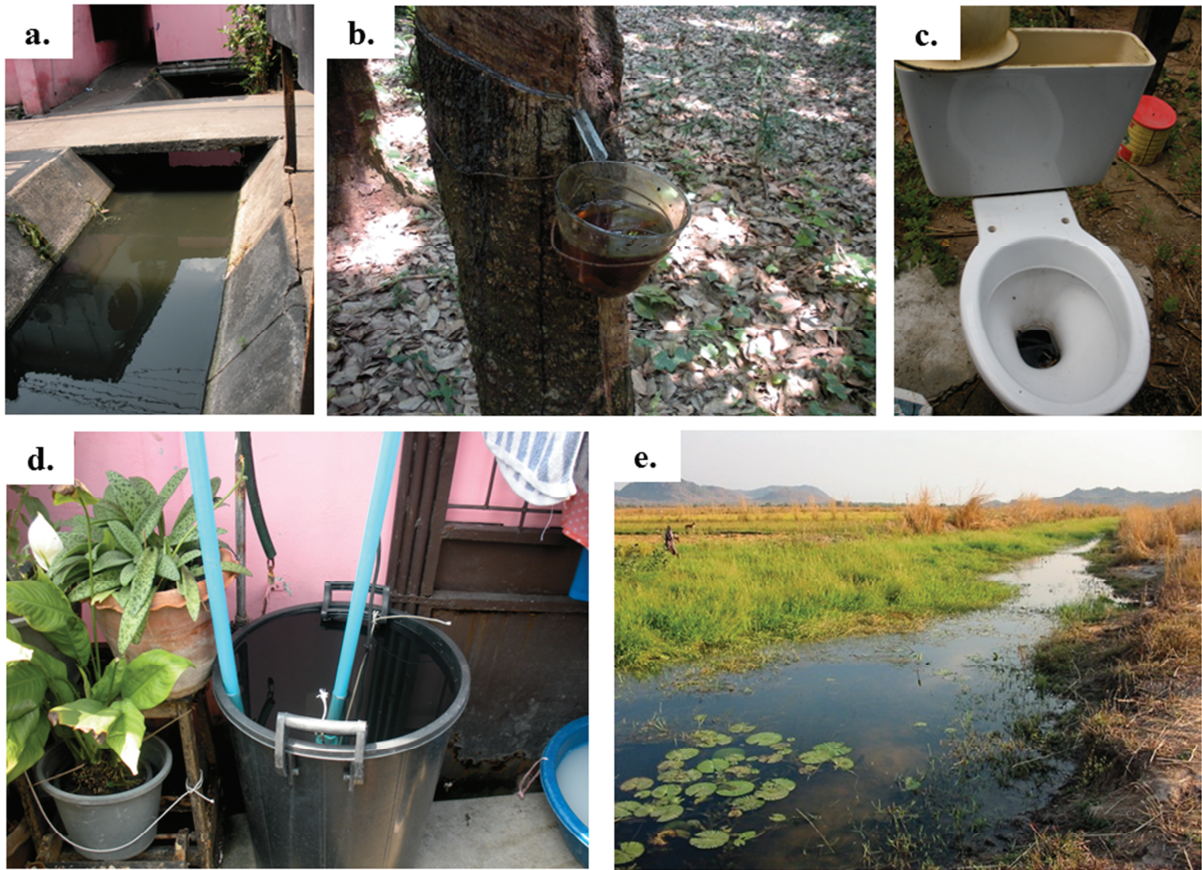


Figure 2 : Diversité des gîtes larvaires : **a.** Egout d'un quartier populaire de Bangkok ; **b.** Vase de récupération de latex dans une plantation d'Hévéas ; **c.** WC à l'abandon dans un village de Guyane ; **d.** Récipient de récupération d'eau de pluie dans un quartier populaire de Bangkok; **e.** Fossé d'irrigation en zone agricole au Cameroun.

Les moustiques, vecteurs de pathogènes

L'entomologie descriptive a apporté beaucoup à la connaissance des moustiques avant d'être relayée par l'**entomologie médicale** du fait que cet insecte est un important **vecteur de pathogènes** pour l'Homme et pour des animaux d'intérêt économique. Parmi toutes les espèces de moustiques, moins de 150 sont estimées vectrices des pathogènes entraînant des maladies à risque pour l'Homme (Harbach, 2007). Parmi les espèces tropicales vectrices de ces pathogènes, les plus connues sont *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles funestus*, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Les maladies induites par ces moustiques peuvent être d'origine parasitaire ou virale et sont responsables de plusieurs millions de morts chaque année (OMS 2015¹). Les plus répandues sont listées dans le **Tableau 1**.

¹ <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fr/>

Maladie	Responsable	Vecteur	Nbr personnes exposées	Nbr personnes infectées par an	Nbr décès par an	Traitement
Filariose	Parasite	<i>C. quinquefasciatus</i>	1,23 milliards (54 pays)	120 millions (2015)	n.c.	Gestion des symptômes
Encephalite japonaise	Virus	<i>C. quinquefasciatus</i>	3 milliards	68000 (2011)	n.c.	Vaccin
Paludisme	Parasite	<i>An. Funestus</i> , <i>An. gambiae</i>	3,5 milliards	198 millions (2013)	600 000 (2013)	Préventif très lourd et très cher
Fièvre jaune	Virus	<i>Ae. Aegypti</i>	900 millions	200 000	30 000	Vaccin
Dengue	Virus	<i>Ae. Aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>	3,9 milliards (128 pays)	400 millions	n.c.	Gestion des symptômes
Chikungunya	Virus	<i>Ae. Aegypti</i> , <i>Ae albopictus</i>	n.c.	850 000	50-100	Gestion des symptômes
Zika	Virus	<i>Ae.aegypti</i> , <i>Ae.albopictus</i> , <i>Ae. Furcifer</i>	n.c.	55 000 en 2013 (polynésie)	n.c.	Gestion des symptômes

Tableau 1 : Principales maladies transmises par les moustiques.

Certaines de ces maladies graves ne font actuellement l'objet d'aucun traitement médical (Griffiths et al. 2011), et le meilleur moyen de limiter la transmission et les épidémies est souvent de **contrôler les populations de vecteurs** (Hemingway et al. 2006).

La lutte contre les moustiques

Les insecticides chimiques

Depuis leur découverte, les **insecticides chimiques** ont été largement utilisés pour le contrôle des insectes nuisibles pour l'Homme. Le premier insecticide de synthèse a été le DDT, créé en 1874 mais dont les propriétés insecticides ont été découvertes par Paul Hermann Muller en 1939. Par la suite, les progrès de la chimie et les nombreux essais réalisés ont permis de créer rapidement des molécules biocides variées, que l'on peut regrouper en **5 familles** principales (**Tableau 2**).

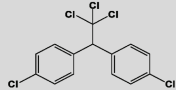
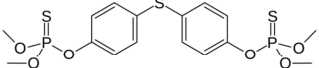
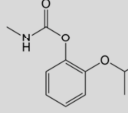
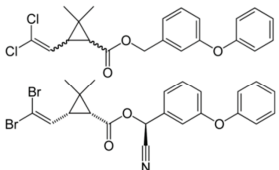
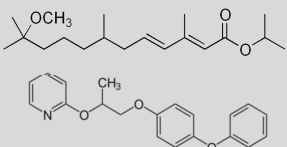
Famille	Abr.	Mode d'action	Exemple	Formule topologique
Organochlorés	OCs	Bloquage du canal sodium voltage-dépendant	DDT	
Organophosphorés	OPs	Inhibition de l'acétylcholine estérase	Téméphos	
Carbamates	Carbs	Inhibition de l'acétylcholine estérase	Propoxur	
Pyrethrinoides	PYRs	Bloquage du canal sodium voltage-dépendant	Perméthrine Deltaméthrine	
Inhibiteurs de croissance	IGRs	Inhibition hormonale - Inhibition de la synthèse de chitine	Méthoprène (hormonal) Pyriproxyfène (synthèse de chitine)	

Tableau 2 : Principales familles d'insecticides chimiques.

Les organochlorés (OCs) : Ces molécules ont été les premières découvertes, notamment avec la synthèse du DDT. Ils agissent en **bloquant les canaux sodium voltage-dépendants** du système nerveux en position ouverte, et empêchent ainsi la repolarisation des membranes permettant la transmission normale du signal nerveux (**Figure 3**). Les effets se traduisent donc par une hyperexcitation des nerfs qui aboutit à une paralysie de l'organisme, puis à la mort si l'effet se prolonge. Le DDT a été très largement utilisé dans des buts variés (militaire, sanitaires ou agricoles). Un programme mondial d'éradication du paludisme basé sur l'utilisation massive de DDT contre les moustiques a été lancé en 1955 par l'OMS, présentant au début un fort succès avec près d'un milliard de personnes exclues de zones à risque. Ce programme d'envergure sera abandonné en 1969 suite à l'apparition de nombreux cas de **résistance** des populations de moustiques au DDT en réponse au traitement intensif (Hemingway et al. 2002). Par ailleurs, de nombreuses études ont montré une forte rémanence et bioaccumulation du DDT, le rendant toxique pour de nombreux taxons, notamment les oiseaux, et conduisant ainsi à son interdiction dans de nombreux pays (Brown 1978). Il reste toutefois utilisable dans certains pays à risque sanitaire élevé selon les recommandations de l'OMS (WHO 2012) du fait de son efficacité face aux populations non-résistantes et de son faible coût. Contre les moustiques, le DDT est le plus souvent appliqué sur les murs des habitations par pulvérisation intra-domiciliaire affectant ainsi les femelles qui s'y posent après

leur repas de sang. Appartenant à un autre groupe d'OCs que le DDT et présentant des propriétés insecticides différentes on peut citer le cyclodiène dieldrine, utilisé comme alternative au DDT jusqu'au début des années 1970s mais qui fait maintenant l'objet de législations strictes dans de nombreux pays car cette molécule est hautement toxique pour l'homme, la faune aquatique et de surcroît très persistante dans l'environnement.

Les organophosphorés (OPs) : les progrès en chimie organique ont ensuite permis le développement des molécules organophosphorées. Certaines de ces molécules ont un pouvoir insecticide, comme par exemple le malathion ou le téméphos. Ils agissent sur les être vivant par **inhibition de l'acétylcholine estérase (Figure 3)**. Lors de la transmission d'un message nerveux, le neurotransmetteur acétylcholine est libéré dans les synapses. Une fois le message transmis par le biais de l'acétylcholine, cette dernière est rapidement dégradée par une enzyme, l'acétylcholine estérase. Le rôle des OPs est alors d'empêcher cette dégradation, entraînant l'accumulation d'acétylcholine dans les synapses, saturant l'organisme de signaux nerveux excitateurs et entraînant une paralysie puis la mort de l'organisme. Ces insecticides sont encore largement utilisés dans le monde en agriculture, mais également en lutte antivectorielle contre les moustiques principalement avec l'utilisation du malathion comme adulticide par pulvérisation et du téméphos comme larvicide. Ces insecticides présentent une forte toxicité pour la faune non cible, notamment les abeilles et la faune aquatique (Kamrin 1997; Sánchez-Bayo 2012) et sont interdits dans l'union européenne ². Cependant en 2014, face à la résistance d'*Aedes aegypti* aux insecticides pyrethrinoïdes en Guyane française, le malathion a été temporairement ré-autorisé comme insecticide de secours pour lutter contre le chikungunya ³.

Les carbamates (Carbs) : les carbamates ont été développés en même temps que les OPs durant la seconde moitié du 20^{ème} siècle. Ils présentent un **mode d'action similaire aux OPs (Figure 3)** mais ces molécules sont rapidement dégradées dans l'environnement ainsi que dans les organismes (WHO, 1986). Même si cette particularité présente un avantage quant à leur impact sur l'environnement (persistance et bioaccumulation), ils sont moins efficaces dans la durée, plus chers que les **pyréthrinoïdes** et le DDT et sont donc moins utilisés que les autres classes d'insecticides. Par ailleurs, cette famille de molécules biocides très diversifiée présente souvent une forte toxicité pour la faune non-cible (Sánchez-Bayo 2012). Le

² Directive biocide 98/8/CE, transposée en droit français aux articles L. 522-1 à L. 522-18 du code de l'environnement.

³ Parution au Journal officiel de l'arrêté du 5 août 2014, signé par le ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie ainsi que celui des Affaires sociales et de la Santé.

bendiocarb et le propoxur sont les deux Carbs les plus utilisés en lutte anti-vectorielle. Ils sont le plus souvent utilisés en aérosol dans les habitations.

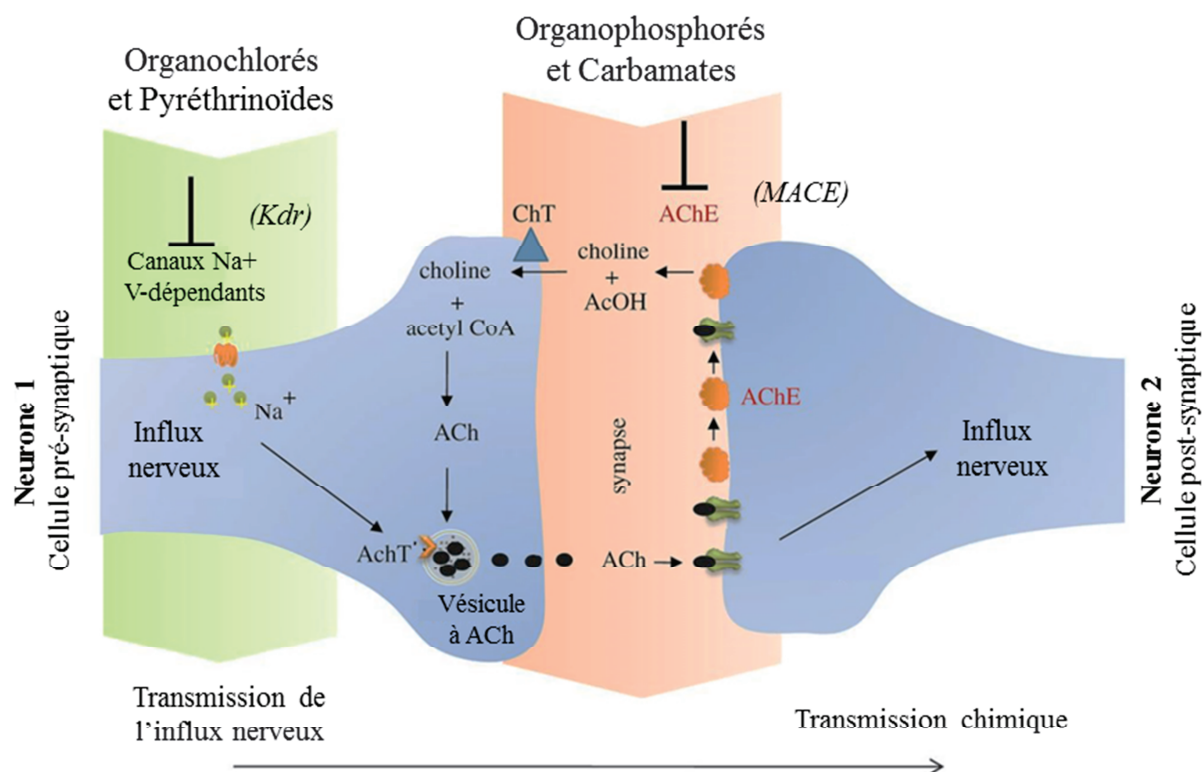


Figure 3: Cibles biochimiques des insecticides chimiques de synthèse (adapté de David et al, 2013). ACh : Acétylcholine ; AChE : Acétylcholine Estérase ; AchT : Transporteur de l'Acétylcholine ; AcOH : Acide acétique ; ChT : transporteur de la Choline ; MACE : Acétylcholine Estérase modifiée ; Kdr : Knockdown résistance.

Les pyréthriinoïdes (PYRs): ce sont des insecticides chimiques de synthèse similaires aux pyréthrines naturelles issus des fleurs comme le pyrèthre ou le chrysanthème. Ils représentent **les dernières molécules insecticides de synthèse autorisées par l'UE**, et agissent par **blocage des canaux sodium voltage-dépendants** dans le système nerveux, comme le DDT (**Figure 3**). Il existe des PYRs de type I, comme la perméthrine, et de type II comme la deltaméthrine qui se différencient par la présence d'un groupement α -cyané pour le type II. Ces molécules insecticides sont actuellement **largement utilisées** dans le monde entier pour le contrôle des populations de moustique du fait de leur efficacité, de leur faible cout et du risque sanitaire réduit sur l'Homme et la majorité des mammifères. On distingue cinq modes d'applications différents pour les pyréthriinoïdes :

1- l'utilisation de solutions insecticides répandues dans les **gîtes larvaires** par voies terrestres ou aériennes (**Figure 4a.**) permet de réduire les populations de vecteurs avant leur émergence, mais l'accessibilité de ces zones représente une contrainte forte pour les traitements larvicides. La toxicité des produits employés à de telles concentrations nécessite une grande attention afin de ne pas contaminer les réservoirs d'eau potable. De plus, de grandes quantités d'insecticides sont utilisées impactant d'autant plus la faune non-cible dans les milieux aquatiques et zones humides riches en biodiversité.

2- la **pulvérisation spatiale** à ultra bas volume (ULV, Figure 4b.) est utilisée en lutte antivectorielle adulticide pour traiter de grandes surfaces en milieu ouvert ou dans des groupements d'habitations. Cette technique de pulvérisation repose sur l'optimisation de nombreux paramètres de traitement, afin de minimiser les volumes utilisés de maximiser l'efficacité de l'insecticide utilisé (Bonds 2012). Ce mode d'application est très efficace en milieu complètement ouvert, mais nécessite plusieurs traitements rapprochés en zones plus encombrées afin de réduire les populations de vecteurs en dessous des seuils indiqués pour limiter la transmission des maladies.

3- les **pulvérisations intra-domiciliaires** (IRSs, **Figure 4c.**) pour imprégner les murs et plafonds des habitations permettent de repousser les moustiques à l'extérieur des habitations ou de tuer ceux se posant sur ces surfaces, après le repas de sang par exemple. Les pyréthrinoïdes α -cyperméthrine, cyfluthrine, deltaméthrine, etofenprox, λ -cyalothrine et bifenthrine présentent une activité insecticide rémanente et sont à la base de ces dispositifs insecticides. Ils ne sont toutefois pas efficaces contre les moustiques diurnes, piquant ainsi la journée et donc souvent hors des habitations.

4- les **moustiquaires imprégnées** (ITNs, Figure 4d.) disposées au-dessus des couchages sont un moyen efficace de lutter contre les moustiques nocturnes et limiter la transmission des maladies comme le paludisme⁴. Les pyréthrinoïdes sont les seules molécules utilisables pour imprégner les moustiquaires. La perméthrine, l' α -cyperméthrine et la deltaméthrine sont principalement utilisées⁵ du fait de leur **stabilité dans le temps**, pouvant être efficaces jusqu'à 12 mois. De plus, une ré-imprégnation manuelle rapide permet de retrouver le plein potentiel insecticide du dispositif. Il existe

⁴ http://www.cdc.gov/malaria/malaria_worldwide/reduction/itn.html

⁵ http://www.who.int/whopes/Long_lasting_insecticidal_nets_06_Feb_2014.pdf?ua=1

également des moustiquaires imprégnées à efficacité insecticide prolongée (LLINs), pouvant ainsi être utilisées pendant 3 ans même après des lavages répétés. Ces dispositifs sont toutefois payants ce qui représente un frein à leur diffusion.

5- les **sprays répulsifs** (Figure 4e.) à base d'insecticides comme la perméthrine ou de solvants comme le DEET⁶ sont destinés à être appliqués sur les vêtements afin de repousser les moustiques diurnes et limiter ainsi le risque de transmission lié à ces vecteurs qui ne sont pas affectés par les IRSs et les ITNs ou LLINs. Même si les répulsifs utilisés dans les zones tropicales sont généralement composés d'insecticides pyréthrinoïdes, il en existe également à base de pyrèthres naturels et de composés aromatiques végétaux comme les huiles essentielles.



Figure 4 : Dispositifs insecticides pour l'utilisation des insecticides pyréthrinoïdes en lutte anti-vectorielle. **a.** Solution insecticide répandue dans un gîte larvaire ; **b.** Pulvérisation à ultra bas volume en milieu rural et urbain ; **c.** pulvérisation intra-domiciliaire résiduelle ; **d.** Moustiquaire imprégnée au-dessus d'un couchage pour protéger des piqûres pendant la nuit ; **e.** imprégnation des vêtements avec un répulsif à base d'insecticide.

⁶ Le DEET (N,N-Diéthyl-3-méthylbenzamide) est un produit chimique utilisé comme répulsif contre les moustiques. Suite à une demande de ré-évaluation de la toxicité potentielle du DEET sur l'Homme (Corbel et al. 2009), l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé a conclu sur un maintien des recommandations d'utilisation actuelles sur ce produit (afssaps 2009).

Les inhibiteurs de croissance (IGRs) : les inhibiteurs de croissance sont des molécules de synthèse qui agissent en **perturbant le cycle de vie** des insectes. Ils empêchent ainsi les insectes de réaliser correctement leurs mues, les bloquant à un stade de développement immature. Ce mode d'action entraîne une impossibilité de reproduction du fait de l'immaturité de l'insecte, ainsi que la mort de celui-ci quelques jours après le traitement. Cette durée est plus longue qu'avec les insecticides chimiques classiques, mais les inhibiteurs de croissance sont associés à un risque réduit pour l'environnement et pour la faune non-cible du fait qu'ils n'agissent pas sur le système nerveux (Sánchez-Bayo 2012). Ils sont également connus pour être plus difficilement impactés par des phénomènes de résistance. On distingue deux principaux groupes d'inhibiteurs de croissance : les inhibiteurs de croissance hormonaux comme le Methoprène et le Pyriproxyfène, et les inhibiteurs de synthèse de la chitine comme le Diflubenzuron. Les inhibiteurs de croissance hormonaux comme le Methoprène et le Pyriproxyfène agissent en mimant l'action de l'hormone juvénile, bloquant l'insecte dans un stade de développement immature. Les inhibiteurs de la synthèse de chitine inhibent la formation de l'exosquelette de l'insecte après une mue, entraînant rapidement la mort de l'insecte. Les moustiques présentent une bonne sensibilité à ces insecticides (Mulla 1991) et ils représentent une bonne alternative en contrôle des vecteurs comme larvicide (Mulla 1995) notamment en combinaison avec d'autres insecticides (Mosqueira et al. 2010). Toutefois, l'utilisation d'autres classes d'insecticides adulticides reste essentielle lors de l'émergence des moustiques depuis les gîtes non traités.

Les alternatives de bio-contrôle

Le Bacille de thuringe (Bt) est décrit comme ayant des propriétés insecticides au tout début du 20^{ème} siècle, à la même époque que la découverte des insecticides chimiques. Cette bactérie sera employée à moindre échelle que ces derniers jusqu'à la fin du 20^{ème} siècle, après quoi elle sera plus largement utilisée notamment grâce à l'avènement de l'agriculture biologique. Vers la fin des années 1970, le ***Bacillus thuringiensis var. Israeliensis (Bti)*** est décrit comme insecticide spécifique des diptères, et sera dès lors utilisé contre les moustiques dans les pays développés (coût élevé) en tant que larvicide, du fait de son efficacité, sa spécificité et du **très faible nombre de cas de résistance** décrits au sein des populations naturelles de moustiques à l'heure actuelle (Wirth et al. 2001; Paul et al. 2006). Le ***Bacillus sphaericus***, découvert en 1995, possède également des propriétés insecticides et est employé contre les moustiques (Baumann et al. 1991; Charles et al. 1996). Toutefois, des phénomènes

de résistance à ce bio-insecticide sont plus répandus que pour le *Bti* (Nielsen-Leroux et al. 1997).

Plusieurs autres micro-organismes comme la **bactérie endosymbiotique** *Wolbachia pipientis* et des **champignons entomopathogènes** appartenant aux genres *Lagenidium*, *Coelomomyces*, *Beauveria*, *Metarhizium* et *Culicinomyces* (Scholte et al. 2004; Kamareddine 2012) représentent des alternatives sérieuses pour la lutte anti-vectorielle. En effet, *Wolbachia pipientis* provoque de nombreuses perturbations chez les moustiques, notamment dans la reproduction, dont elle tire avantage et qui peuvent être exploitées en lutte anti vectorielle afin de réduire les populations de moustiques (Iturbe-Ormaetxe et al. 2011). Les champignons entomopathogènes représentent un moyen de lutte anti-vectoriel potentiel par leurs spores, qui peuvent se fixer sur la cuticule des moustiques, germer, et ainsi permettre au champignon de se disséminer dans l'organisme hôte entraînant dans certains cas la mort (Singh et Prakash 2014).

Enfin, une autre approche de bio-contrôle efficace contre les moustiques consiste en l'utilisation de **poissons** se nourrissant de larves, comme les Guppys (*Poecilia reticulata* et *Gambusia affinis*) (Chandra et al. 2008). Cette méthode est utilisée depuis le début des années 1900s avant même l'existence d'insecticides chimiques de synthèse, mais elle a été relayée par le DDT suite aux recommandations de l'OMS à l'époque avant d'être à nouveau intégrée dans les plans de « lutte anti-vectorielle intégrée ».

De nos jours, de nouvelles techniques de bio-contrôle font leur apparition grâce aux **progrès en génétique et en biologie moléculaire**. Concernant la lutte anti-moustiques, différentes approches basées sur des lâchés massifs de **souches modifiées** de moustiques **mâles** sont au rang d'essai :

- 1- souches stériles (lignées génétiquement modifiées ou moustiques irradiés) lâchées en grand nombre pour supplanter les mâles naturels féconds et faire chuter drastiquement le potentiel reproductif des femelles dans les populations naturelles (Alphey et al, 2010).
- 2- souche d'*Ae. aegypti* génétiquement modifiée (souche OX513A⁷) engendrant une descendance non viable, périssant rapidement au stade larvaire.
- 3- souche d'*Ae. albopictus* génétiquement modifiée (souche OX3688⁸) portant un gène

⁷ <http://www.oxitec.com/health/our-products/aedes-agypti-ox513a/>

⁸ <http://www.oxitec.com/health/our-products/aedes-albopictus-3688c/>

dominant conférant l'incapacité au vol aux femelles héritant de ce gène. Ainsi, des lâchers réguliers de mâles porteurs de ce gène conduiront à des descendance comportant de nombreuses femelles incapables de voler, donc d'effectuer un repas sanguin réduisant ainsi la transmission de maladies.

Même si les alternatives de bio-contrôle des moustiques semblent être efficaces et/ou prometteuses en lutte anti-vectorielle, **la seule alternative actuellement valable** pour la majorité des pays à risque est **l'utilisation d'insecticides chimiques** (Hemingway et al. 2006) en raison de leur faible coût, de leur efficacité, de leur facilité d'utilisation et de leur acceptation par les populations humaines.

II. La résistance aux insecticides : une histoire de sélection.

Adaptation et résistance des moustiques aux insecticides

La fascinante capacité d'adaptation des insectes à leur environnement a abouti à l'apparition dans les années 1950s de phénomènes de **résistance**. Ces phénomènes ont émergé très rapidement suite à l'utilisation intensive des insecticides chimiques de synthèse, et sont maintenant largement répandus à de nombreuses familles d'insectes considérés comme nuisibles et à l'ensemble des classes d'insecticides connues (**Figure 5**).

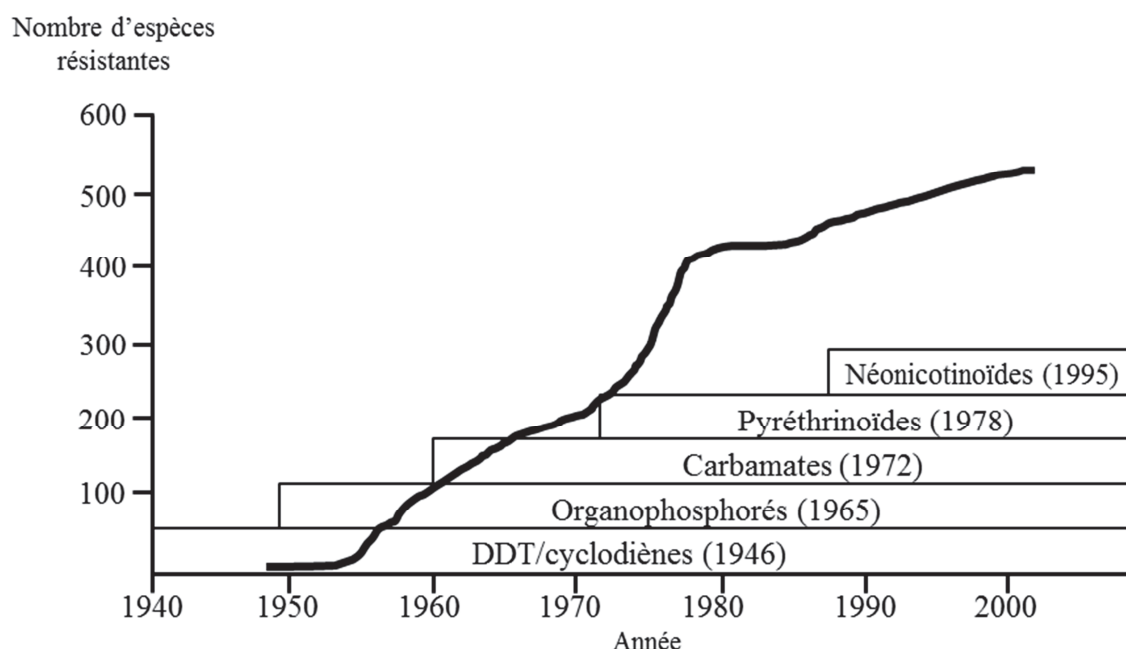


Figure 5: Evolution de la résistance des insectes aux insecticides (adapté de Georgiou 1990).

L'utilisation intensive et répétée d'insecticide constitue une **pression de sélection** artificielle, plus intense et plus rapide que la sélection naturelle. Une faible proportion d'individus survivent à chaque traitement insecticide, se reproduisent entre eux et transmettent ainsi leurs caractères génétiques de meilleure survie à l'insecticide à leur descendance. Le temps de génération souvent très court des insectes en fait de très bons sujets à l'apparition de résistance dans les populations traitées aux insecticides (Ffrench-Constant et al. 2004). **Les moustiques** ne dérogent pas à cette règle, et de nombreuses populations sont devenues **extrêmement résistantes** et ce même aux **dernières classes d'insecticides** mises sur le marché comme les PYRs. Face à ce constat alarmant et à la difficulté de créer, de tester et d'homologuer de nouvelles méthodes de lutte, il est indispensable de mieux **comprendre** ces mécanismes de résistance, afin de prolonger l'efficacité des insecticides actuels pour assurer la viabilité de la **lutte anti-vectorielle**.

La résistance des moustiques aux insecticides peut être due à plusieurs mécanismes (**Figure 6**), comme un comportement d'évitement de la molécule insecticide (**résistance comportementale**), la **modification de la cible** biochimique de l'insecticide par mutation, une diminution de la pénétration de la molécule dans l'organisme (**résistance cuticulaire**), sa **séquestration** au sein de l'organisme ou sa biodégradation par des enzymes de détoxification (**résistance métabolique**) (Hemingway et al. 2004). La résistance par modification de cible et la résistance métabolique sont considérées comme les deux causes principales de la résistance chez les moustiques.

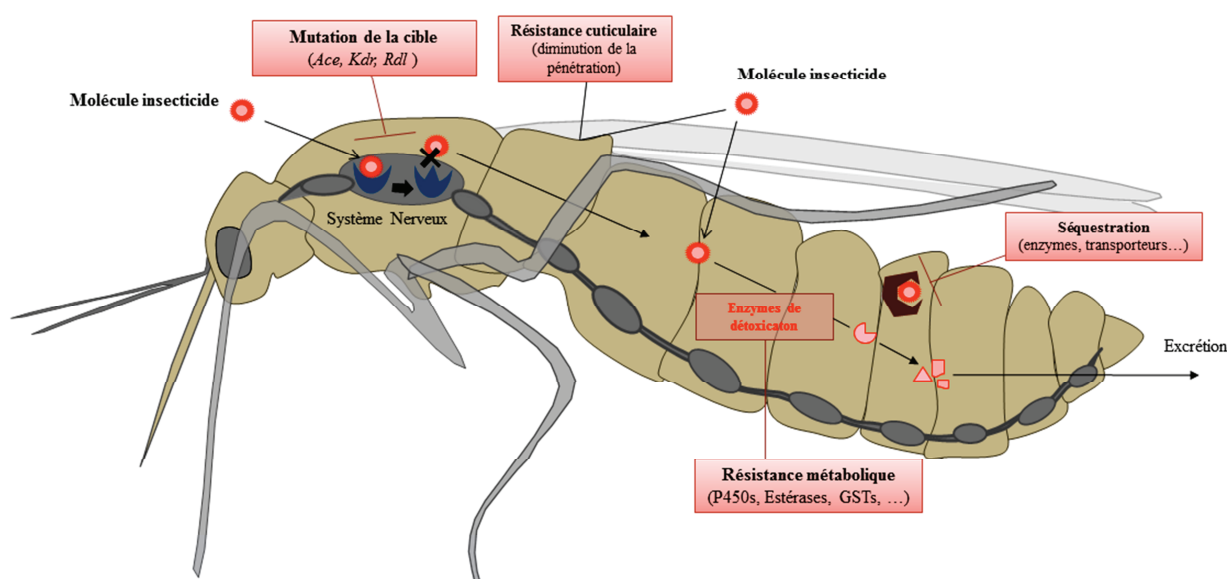


Figure 6: Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques chez le moustique (adapté du rapport « utilisation des insecticides et gestion de la résistance », CNEV 2014)

Résistance comportementale

La **résistance comportementale** consiste en une modification du comportement de l'insecte aboutissant à un **évitement** de l'insecticide. De cette façon, l'utilisation massive de moustiquaires imprégnées d'insecticide en Afrique semble par exemple avoir entraîné une modification de comportement des femelles du genre *Anopheles*, qui décalent leur période de repas sanguin vers la période diurne (Stone et al. 2012) ou optent pour un régime plus zoophile (Green et al. 1990).

Résistance cuticulaire et séquestration

Ces deux mécanismes de résistance ont comme point commun d'empêcher la molécule d'atteindre sa cible. La **résistance cuticulaire** est engendrée par une modification de la composition ou un épaissement de la cuticule de l'insecte, **limitant la pénétration** de la molécule, diminuant ainsi son efficacité. Wood et al. (2010) ont ainsi montré grâce à la microscopie électronique à balayage que l'épaisseur de la cuticule d'une population d'*An. funestus* était positivement corrélée à sa tolérance à la perméthrine. La **séquestration** de l'insecticide est quant à elle possible grâce aux **transporteurs cellulaires** ou à des **enzymes** qui reconnaissent la molécule comme substrat sans pour autant la métaboliser (Hemingway et Karunaratne 1998). Les estérases peuvent par exemple entraîner une résistance aux insecticides OPs chez *Culex quinquesfasciatus* (Karunaratne et al. 1993). Leur affinité pour l'insecticide ainsi que leur surproduction par amplification génique entraîne une séquestration importante des molécules insecticides, conférant la résistance. Leur affinité plus importante pour les OPs que l'affinité entre l'insecticide et sa cible biochimique renforce d'autant plus l'efficacité de ce mécanisme de résistance (Karunaratne et al. 1993).

Résistance par mutation de la cible

Les insecticides chimiques comme les OCs, OPs, Carbs et PYRs se fixent sur des protéines (cibles) du système nerveux du moustique, altérant alors leur fonctionnement et entraînant la mort de l'insecte. Des **mutations sur ces cibles** empêchant la fixation et l'action de l'insecticide ont été découvertes sur les différentes protéines ciblées par les insecticides chez des insectes résistants. Les gènes codant pour ces protéines et affectés par ces mutations sont bien conservés chez les insectes car ils sont impliqués dans les mêmes processus physiologiques élémentaires et essentiels (système nerveux). Ainsi, les différentes mutations de cibles présentées ci-dessous sont fréquemment présentes chez l'ensemble des moustiques d'importance sanitaire.

Mutation du récepteur GABA : le **récepteur GABA** est un canal ionique membranaire où vient se fixer l'acide γ -aminobutyrique. C'est la cible de certains insecticides OCs comme la dieldrine, le lindane ou des phénylpyrazoles comme le fipronil. Ces insecticides se fixent sur ce récepteur, bloquant leur fonctionnement et perturbant le flux d'ions chlorure dans le système nerveux entraînant la mort de l'insecte par hyperexcitation synaptique. Une mutation non-synonyme entraînant le remplacement de l'acide aminée alanine en position 302 par une sérine (A302S) ou une glycine (A302G) engendre un phénotype de résistance chez de nombreux insectes (Ffrench-Constant et al. 2000). Cette mutation a aussi été trouvée dans des populations de moustiques des genres *C. quinquefasciatus*, *Ae. albopictus* (Tantely et al. 2010), *An. gambiae* (Brooke et al. 2006) et *Ae. Aegypti* (Thompson et al. 1993).

Mutation de l'acétylcholinestérase : l'**acétylcholinestérase** est la cible des OPs et Carbs, et est codée par les gènes *Ace-1* et *Ace-2*. Deux mutations ont été découvertes sur ces gènes. La mutation F455W sur le gène *Ace-2* confère la résistance aux Carbs chez le puceron *Myzus persicae* (Nabeshima et al. 2003), et aux OPs chez l'aleurode du tabac *Bemisia tabaci* (Alon et al. 2008) et le moustique *Culex tritaeniorhynchus* (Nabeshima et al. 2004). La mutation G119S (Weill et al. 2004) sur le gène *Ace-1* est principalement retrouvée dans les populations résistantes des moustiques *An. gambiae* et *C. quinquefasciatus* (Weill et al. 2002) ainsi que d' *Ae. aegypti* (Muthusamy et Shivakumar 2015).

Mutation du canal sodium voltage-dépendant : des modifications du **canal sodium voltage-dépendant** ont été retrouvées chez de nombreux insectes résistants aux OCs et aux PYRs (Rinkevich et al. 2013) dont les moustiques (Liu 2015). Les individus porteurs de cette mutation sont moins affectés que les sensibles par la paralysie rapide (effet « Knockdown ») engendrée suite au contact avec les insecticides pyrethroïdes ; c'est pourquoi cette mutation est dénommée **Kdr**, pour « Knockdown résistance ». Plusieurs mutations ont ainsi été décrites chez plusieurs espèces de moustique. Ainsi, trois mutations différentes sont présentes chez *An. gambiae* (L1014F (Martinez-Torres 1998), L1014S (Ranson et al. 2000a) et N1575Y (Jones et al. 2012)), deux chez *C. quinquefasciatus* (L1014F et L1014S (Martinez-torres et al. 1999)) et huit chez *Ae. aegypti* (V1016G, I1011M (Brengues et al. 2003), V1016I, I1011V (Saavedra-Rodriguez et al. 2007), F1269C (Kawada et al. 2009), F1534C (Yanola et al. 2010), D1794Y (Chang et al. 2009) et S989P (Brengues et al. 2003)).

Des études ont montré un coût de ces mutations de cible sur la fitness des organismes porteurs (Platt et al. 2015; Brito et al. 2013), qui restent malgré tout largement avantageuses et

sélectionnées dans un contexte de lutte anti-vectorielle car elles diminuent de manière importante l'efficacité des insecticides. Une étude récente (Du et al. 2013) décrit l'effet de chacune de ces mutations du canal sodium voltage-dépendant, montrant que seules les mutations L1014F, I1011M, L1014S, V1016G et F1534C réduisent la sensibilité envers les PYRs. Par ailleurs, l'implication de toutes les mutations décrites n'a pas été validée et certaines pourraient jouer un rôle d'ajustement (diminution des coûts) (SupYoon et al. 2008) ou simplement être physiquement associées aux vraies responsables de la résistance.

Ces mutations de cible ont longtemps été décrites comme les principales responsables de la résistance. Aujourd'hui, les mécanismes de résistance des moustiques aux insecticides sont de mieux en mieux documentés, et il apparaît très souvent que la **résistance métabolique** occupe une part importante dans le phénotype global de résistance. Toutefois, les rouages fins de ce mécanisme complexe restent souvent méconnus.

Résistance métabolique

La **résistance métabolique** consiste en une **dégradation** de la molécule insecticide par des **enzymes**, appartenant généralement au système de **détoxication** de l'insecte. Les insectes étant constamment exposés à des xénobiotiques naturels comme les composés allélopathiques des plantes ou à des xénobiotiques anthropiques comme les pesticides, ils sont dotés d'un système permettant de s'en protéger naturellement. Certaines de ces enzymes montrent de bonnes capacités à dégrader les molécules insecticides, les rendant moins toxiques ou plus hydrophiles et facilitant ainsi leur excrétion. On distingue ainsi quatre familles principales d'enzyme de détoxication connues pour jouer un rôle dans la résistance aux insecticides (Hemingway et al. 2004; Li et al. 2007): les **monooxygénases à cytochrome P450** (P450s ou CYPs pour les gènes), les **carboxy/choline estérases** (CCEs), les **glutathion-S-transférases** (GSTs) et les **UDP glucosyl transférases** (UDPGT) qui jouent probablement un rôle important dans la résistance même si elles restent encore méconnues. Ces enzymes peuvent être classées en deux catégories : les enzymes de **phase I** et les enzymes de **phase II** (**Figure 7**).

Durant le métabolisme d'un composé xénobiotique, la **phase I** est une étape d'**oxydation**, de **réduction** ou d'**hydrolyse** qui conduit à la formation de métabolites, qui peuvent être soit éliminés directement s'ils ont atteint un degré d'hydrophilie suffisant, soit être pris en charge dans une réaction de phase II. Les enzymes impliquées dans ces réactions de phase I sont principalement les P450s pour les oxydations et les estérases pour les

hydrolyses. Les métabolites formés par les réactions de phase I ont des groupes fonctionnels hydroxyles (OH), amines (NH₂) ou carboxyles (COOH) qui peuvent ensuite être conjugués par les réactions de phases II. Toutefois, les réactions de phase I ne sont pas toujours suivies d'une réaction de phase II, et inversement certains xénobiotiques peuvent directement subir des réactions de phase II sans modification de phase I au préalable.

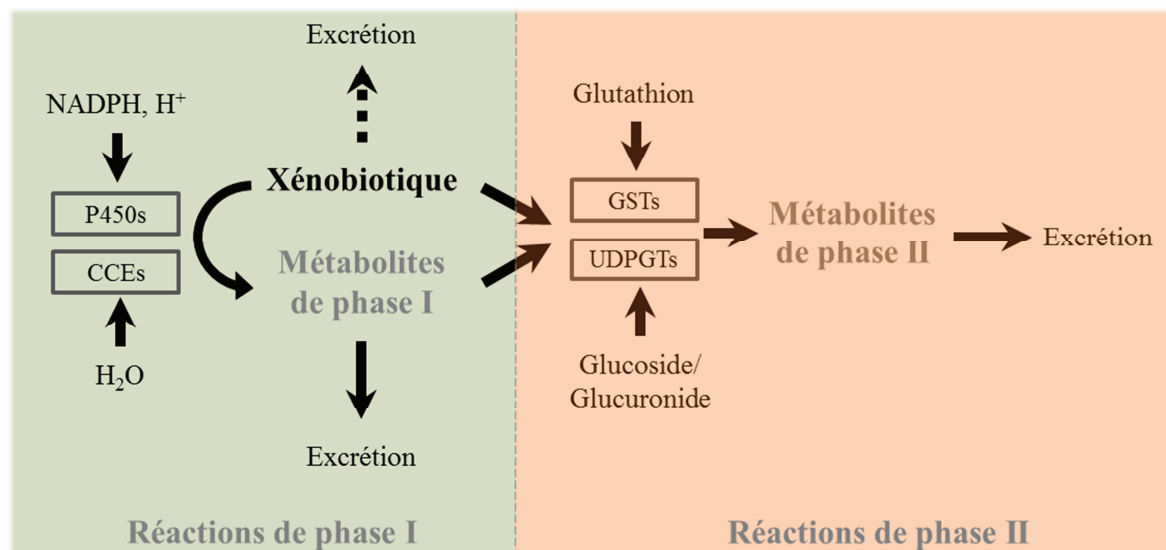


Figure 7 : Processus de détoxification d'un composé xénobiotique.

Une réaction de **phase II** consiste en une réaction de **conjugaison** qui aboutit à la formation d'un xénobiotique conjugué, hydrosoluble et plus facilement excrétable. Les enzymes de la famille des transférases jouent ce rôle, conjuguant par exemple un glutathion pour les GSTs, et un glucoside/glucuronide pour les UGTs/UDPGTs.

Cytochromes P450 : les cytochromes P450 sont une superfamille de mono-oxygénases, hémoprotéines (protéines à noyau ferreux) membranaires microsomiales ou solubles qui catalysent des réactions d'oxydation nécessitant de l'oxygène et du NADPH (**Figure 8a.**). Ce sont des protéines d'environ 500 acides aminés, possédant une nomenclature spécifique (**Figure 8b.**) qui permet de répartir les différents P450s de chaque espèce en familles et en sous-familles. Il existe un grand nombre d'isoenzymes, avec près d'une soixantaine recensées chez l'homme à ce jour, et 160 chez le moustique *Aedes aegypti* (Strode et al. 2008).

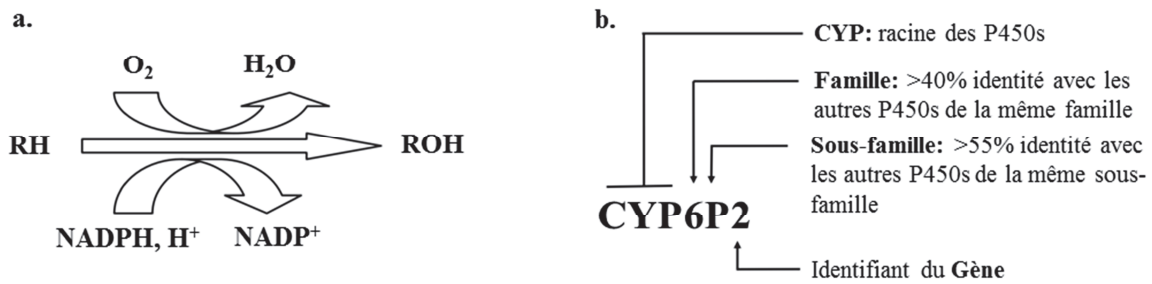


Figure 8: Cytochrome P450 : a. réaction catalysée et b. nomenclature.

CCEs : les carboxylestérases sont des enzymes catalysant des réactions d'hydrolyse de liaisons esters carboxyliques, aboutissant à la formation d'un acide et d'un alcool (**Figure 9**).

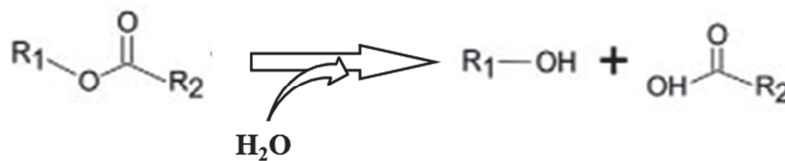


Figure 9: Réaction d'hydrolyse catalysée par les carboxylestérases.

La nomenclature de ces estérases n'est pas unanimement définie du fait de leur faible spécificité de substrats ou du manque de connaissances de ces derniers. Toutefois, la classification proposée par (Aldridge 1953) est généralement reconnue et utilisée. Ainsi, les estérases inhibées par le paraoxon sont appelées B estérases, celles qui ne le sont pas sont appelées A estérases. D'autres classifications spécifiques d'une espèce ou d'un groupe existent, comme par exemple pour les moustiques du genre *Culex*. Cette nomenclature spécifique est basée sur la capacité d'hydrolyser le substrat synthétique α -naphtyl acétate pour les α -estérases et le β -naphtyl acétate pour les β -estérases. Il existe en moyenne une cinquantaine d'estérases chez le moustique (Ranson et al. 2002; Strode et al. 2008).

GSTs : enzymes de la famille des transférases, les glutathion-S-transférases catalysent principalement des réactions de **conjugaison** du glutathion réduit (GSH) sur un substrat endogène ou un xénobiotique (**Figure 10a.**). Elles peuvent également réaliser des **dehydrochlorinations**, présenter une activité **peroxydase** ou enfin servir de **transporteur** cellulaire en se liant à un substrat. Il existe trois types de GSTs chez les eucaryotes que sont les GSTs microsomales, cytosoliques et mitochondriales. Seules des GSTs cytosoliques ont pour l'instant été associées à des mécanismes de résistance aux insecticides (Hemingway et al. 2004; Enayati et al. 2005; Ranson et Hemingway 2005). On dénombre au moins 6 familles de GSTs cytosoliques, mais la majorité des GSTs d'insectes appartiennent aux classes

dénommées Delta (GSTD) et Epsilon (GSTE), qui sont d'ailleurs spécifiques des insectes (**Figure 10b**).

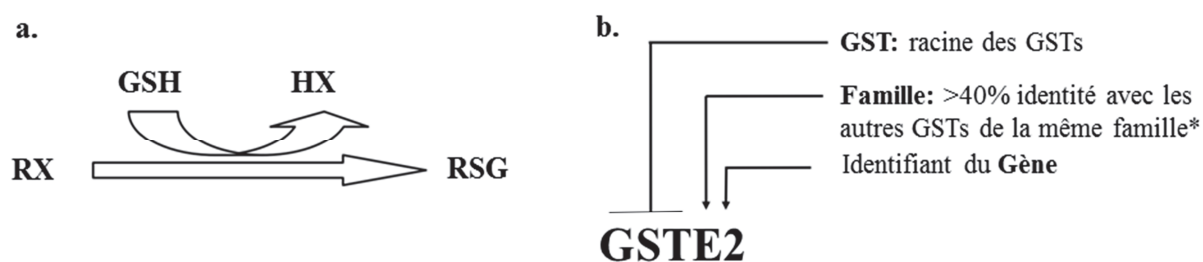


Figure 10: Glutathion-S-transférases : **a.** Réaction de conjugaison et **b.** Nomenclature.

UDPGTs : appartenant également à la famille des transférases, ces enzymes peu décrites chez les insectes conjuguent un monosaccharide (glucoside) sur des substrats variés, le plus souvent un alcool ou une amine.

Enzymes de détoxification et bases moléculaires de la résistance métabolique

En théorie, la **résistance métabolique** est conférée par la **surproduction d'enzymes** de détoxification et/ou par des **modifications qualitatives** de leur séquence protéique, améliorant leur affinité et/ou leur activité catalytique vis à vis des insecticides.

Surproduction des enzymes de détoxification

Parmi les mécanismes engendrant la surproduction d'une enzyme de détoxification, la **sur-transcription** du gène codant pour cette protéine est souvent décrite dans les phénomènes de résistance des insectes aux insecticides. On distinguera alors la **sur-expression**⁹ **constitutive** de l'**induction**. La sur-expression constitutive est acquise au fil des générations de sélection et confère un niveau basal d'expression du gène en question plus élevé chez les populations résistantes que chez les populations sensibles. Pléthore d'articles décrivent des sur-expressions de gènes associées à la résistance des moustiques aux insecticides, particulièrement depuis l'apparition des techniques de screening moléculaire transcriptomiques. La **sur-expression constitutive** peut alors être engendrée par une modification des **éléments cis/trans régulateurs** des gènes ou par une augmentation du **nombre de copies** du gène héritées au fil des générations. L'**induction** quant à elle représente

⁹ Dans la littérature scientifique traitant de la résistance des moustiques aux insecticides, l'amalgame est souvent fait entre « expression » et « transcription ». Pour une meilleure lisibilité, le terme « expression » sera préférentiellement choisi dans cette thèse mais les approches utilisées étant d'ordre transcriptomique, il traduira en réalité le processus de transcription.

le potentiel d'un gène à voir son expression influencée par des facteurs exogènes. Dans le cas de la résistance métabolique, la capacité d'induction d'un gène de détoxification par un insecticide permet sa sur-expression rapide en réponse à la présence de la molécule toxique. L'inductibilité accrue d'une enzyme vis-à-vis d'un substrat comme par exemple un insecticide est souvent causée par la sélection d'éléments *cis/trans* régulateurs plus réactifs au substrat.

Une **meilleure stabilité des ARNm** permet d'allonger leur durée de vie et représente ainsi un mécanisme potentiel de surproduction d'enzymes de détoxification chez les moustiques comme chez les mammifères (Suredj et al. 1994; Hoy 2003; Opyrchal et al. 2005). La durée de vie des ARNm conditionne directement la possibilité de traduction par les ribosomes, et donc l'expression du gène concerné (Ross 1995; Huch et Nissan 2014). Ce mécanisme reste toutefois très peu décrit dans le cadre de la résistance des insectes aux insecticides.

Enfin, une **traduction accrue** des ARNm permet potentiellement la surproduction d'enzymes de détoxification. Elle est rendue possible principalement par une meilleure accessibilité du codon d'initiation, permettant ainsi de recruter plus de ribosomes (Espah Borujeni et al. 2014). A ma connaissance, aucune étude ne traite du sujet dans le cadre de la résistance des insectes aux insecticides.

Modifications qualitatives

Des **mutations non-synonymes** dans la séquence codante des gènes de détoxification peuvent entraîner une modification des propriétés des enzymes envers les molécules insecticides. Le changement de conformation de la protéine et/ou le changement d'acides aminés dans son site actif peuvent contribuer à l'**amélioration de sa capacité de bio-dégradation ou de séquestration**.

Les enzymes de détoxification impliquées dans la résistance aux insecticides

Les principales catégories d'enzymes de détoxification impliquée dans des phénomènes de résistance métabolique aux insecticides appartiennent aux **cytochromes P450** (P450s), aux **carboxy/choline estérases** (CCEs), aux **glutathion-S-transférases** (GSTs) et aux **UDP-glucosyl/glucuronyl transférases** (UDPGTs).

Cytochrome P450s : certains P450s interviennent dans le métabolisme de composés endogènes comme les hormones et les lipides ou exogènes comme les composés allélopathiques de plantes et les insecticides (Li et al. 2007). De nombreuses études montrent le **rôle des P450s** dans la **résistance** d'insectes comme *Drosophila melanogaster* et *Musca domestica* à différents insecticides (Bergé et al. 1998; Le Goff et al. 2003; Daborn et al. 2007). Ainsi, Cyp6g1 apparaît comme responsable d'une partie de la résistance de *D. melanogaster* au DDT, au Nitenpyram et au Dicyclanil (Daborn et al. 2002, 2007). Le gène *Cyp6a2* a aussi été lié à la résistance au DDT chez *D. melanogaster* (Dunkov et al. 1997; Amichot et al. 2004). Chez *M. domestica*, CYP6A1, CYP6D1 et CYP12A1 sont responsables ou associés à la résistance aux organochlorés, organophosphorés et pyréthrinoïdes (Andersen et al. 1994; Tomita et Scott 1995; Guzov et al. 1998).

Les **P450s** apparaissent également être largement **impliqués dans la résistance des moustiques aux insecticides**. Globalement les familles *CYP6* et *CYP9* représentent la majorité des gènes de P450s candidats à la résistance métabolique, c'est-à-dire potentiellement impliqués dans la métabolisation des insecticides chez les moustiques *An. gambiae* (Félix et Silveira 2012; David et al. 2013), *Ae. aegypti* (David et al. 2013; Kasai et al. 2014) et *C. quinquefasciatus* (David et al. 2013; Scott et al. 2015). Certaines de ces enzymes ont ensuite été validées par des approches fonctionnelles comme capables de dégrader les molécules insecticides (**Tableau 3**).

Nom du gène	N° accession Vectorbase	Espèce de moustique	Insecticide métabolisé	Référence	Homologues
CYP6P3	AGAP002865	<i>An. gambiae</i>	Perméthrine et Deltaméthrine	Djouaka et al. 2008, Müller et al. 2008a, Müller et al. 2008b	<i>Ae. aegypti</i> : AAEL012491 (CYP6P12); AAEL014891 (97%CYP6P12) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ005955 (CYP6P14)
CYP6M2	AGAP008212	<i>An. gambiae</i>	Deltaméthrine et DDT	Djouaka et al. 2008, Stevenson et al. 2011, Mitchell et al. 2012	<i>Ae. aegypti</i> : AAEL009127 (CYP6M11) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ019848 (CYP6M14); CPIJ019848 (CYP6M16)
CYP6Z1	AGAP008219	<i>An. gambiae</i>	DDT	David et al. 2005, Chiu et al. 2008	<i>Ae. aegypti</i> : AAEL009131 (CYP6Z8); AAEL009123 (CYP6Z6) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ019587 (CYP6Z14)
CYP6Z2	AGAP008218	<i>An. gambiae</i>	Métabolites des pyréthrinoïdes (Pbald et Pbald)	Chandor-Proust et al. 2013	<i>Ae. aegypti</i> : AAEL009123 (CYP6Z6); AAEL009129 (CYP6Z9) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ019587 (CYP6Z14)
CYP9M6	AAEL001312	<i>Ae. aegypti</i>	Permethrine	Kasai et al. 2014	<i>An. gambiae</i> : AGAP009375 (CYP9M1) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ014218 (CYP9M10)
CYP6BB2	AAEL014893	<i>Ae. aegypti</i>	Permethrine	Kasai et al. 2014	<i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ005952 (CYP6BB4)
CYP6Z8	AAEL009131	<i>Ae. aegypti</i>	Métabolites des pyréthrinoïdes (Pbald et Pbald)	Chandor-Proust et al. 2013	<i>An. gambiae</i> : AGAP008218 (CYP6Z2) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ019587 (CYP6Z14)
CYP9J24	AAEL014613	<i>Ae. aegypti</i>	Perméthrine	Strode et al. 2008, Stevenson et al. 2012	<i>An. gambiae</i> : AGAP012296 (CYP9J5) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ010546 (CYP9J34)
CYP9J28	AAEL014617	<i>Ae. aegypti</i>	Perméthrine	Strode et al. 2008, Stevenson et al. 2012	<i>An. gambiae</i> : AGAP012296 (CYP9J5) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ010546 (CYP9J34)
CYP9J32	AAEL008846	<i>Ae. aegypti</i>	Perméthrine et Deltaméthrine	Bingham et al. 2011, Strode et al. 2008, Stevenson et al. 2012	<i>An. gambiae</i> : AGAP012296 (CYP9J5) <i>C. quinquefasciatus</i> : CPIJ010543 (CYP9J40)
CYP4H34	CPIJ011127	<i>C. quinquefasciatus</i>	Perméthrine	Wilding et al. 2012, Komagata et al. 2010	<i>An. gambiae</i> : AGAP000088 (CYP4H19)
CYP9M10	CPIJ014218	<i>C. quinquefasciatus</i>	Perméthrine et Deltaméthrine	Wilding et al. 2012, Hardstone et al. 2010, Itokawa et al. 2010	<i>Ae. aegypti</i> : AAEL001312 (CYP9M6)

Tableau 3: Cytochromes P450 de moustiques dont le rôle dans la résistance aux insecticides a été validé.

Des **modifications qualitatives**, ou mutations, ont également été découvertes dans des P450s en lien avec la résistance. Des études décrivent le rôle de telles modifications chez *D. melanogaster* avec notamment les mutations R335S, L336V et V476L dans le gène *Cyp6a2* responsables d'une métabolisation accrue du DDT (Amichot et al. 2004). Concernant les **moustiques**, **peu d'études** mettent l'accent sur de telles modifications. Deux mutations ponctuelles portant sur les gènes *CYP6P4* et *CYP6P9* d'*An. funestus* semblent également étroitement liées à la résistance aux PYRs (Wondji et al. 2009), mais leur rôle dans la bio-dégradation des insecticides n'a pas été validé.

CCEs : La **résistance** aux insecticides basée sur les **estérases** est très **répandue**. Elles peuvent par exemple conférer la résistance aux pyréthrinoïdes chez le puceron *Myzus persicae* (Devonshire et Moores 1982) et constituent le principal mécanisme de résistance des moustiques aux insecticides OPs et le second pour la résistance au Carbs (Peiris & Hemingway 1993). Chez le genre *Culex*, la résistance conférée par les estérases réside dans la séquestration très rapide de l'insecticide par ces enzymes puis de sa dégradation lente

(Karunaratne et al. 1993). Les estérases $\text{est}\alpha 2^1$ et $\text{est}\beta 2^1$ sont ainsi les principales responsables de la résistance de *C. quinquefasciatus* aux OPs (Vaughan et Hemingway 1995; Vaughan et al. 1997). Un peu différemment, des activités estérases élevées ont été retrouvées dans des populations résistantes aux OPs d'*Ae aegypti* (Marcombe et al. 2009, 2012; K. Saavedra-Rodriguez et al. 2014) suggérant leur rôle dans la résistance par leur activité catalytique. Le rôle des estérases dans la résistance et le métabolisme des PYRs a également été montrée chez les mammifères (Hodgson 2003; Nakamura et al. 2007) et chez le moustique (Somwang et al. 2011; Chandor-Proust et al. 2013). Néanmoins, aucune estérase spécifique n'a encore été validée comme capable de dégrader les PYRs chez les moustiques.

Peu d'études mettent l'accent sur les **modifications qualitatives** responsables de la résistance affectant des estérases. Les mutations G137N et W251L des estérases $\text{Lc}\alpha\text{E7}$ et $\text{Md}\alpha\text{E7}$ chez *L. cuprina* et *M. domestica* contribuent à la résistance aux OPs (Newcomb et al. 1997; Campbell et al. 1998; Claudianos et al. 1999). Des mutations ponctuelles de l'estérase E3 ont également été associées au métabolisme des PYRs chez *L. cuprina* (Heidari et al. 2005; Devonshire et al. 2007; Coppin et al. 2012). Concernant les **moustiques**, des mutations non-synonymes ont été découvertes dans l'estérase CCEAE3A d'*Ae. aegypti* en lien avec la résistance au téméphos (Poupardin et al. 2014), mais leur rôle n'a pas encore été validé.

GSTs : des niveaux élevés de l'activité de ces enzymes ont été détectés dans des populations d'insectes résistants aux OCs (Prapanthadara L. et al. 1995), OPs (Wei SH. et al. 2001) et PYRS (Vontas et al. 2002). Chez *M. domestica* MdGSTD3 est impliquée dans la résistance aux OPs (Wang J. et al. 1991; Syvanen et al. 1994), tandis que NlGSTD1 est impliquée dans la résistance de *Nilaparvata lugens* aux PYRs non pas grâce à un métabolisme direct, mais grâce à son activité peroxydase (Vontas et al. 2002) qui freine les peroxydations lipidiques induites par les PYRs. Concernant les moustiques, il a été montré qu'AgGSTE2 d'*An. gambiae* et son orthologue chez *Ae. aegypti* (AaGSTE2) confèrent une résistance au DDT par déchloration (Ranson et al. 2001; Ortelli et al. 2003; Lumjuan et al. 2005). AaGSTE2 a aussi fréquemment été rencontrée sur-exprimée chez les populations résistantes aux PYRs (Strode et al. 2008; Marcombe et al. 2012; Saavedra-Rodriguez et al. 2012).

Enfin, une étude récente de Riveron et al. (2014) montre que la **mutation** L119F sur GSTE2 contribue à la résistance au DDT chez *An. funestus* en augmentant l'activité de métabolisme du variant vis-à-vis de l'insecticide.

UDPGTs : une seule étude montre le rôle des **UDPGTs** dans la résistance d'*Haemoncus contortus* à l'OP Naphtalophos (Kotze et al, 2014). Chez les moustiques, les UDPGTs apparaissent affectées à plusieurs reprises chez les populations résistantes (Poupardin et al. 2012; David et al. 2014) mais leur rôle précis dans le métabolisme des insecticides reste encore **méconnu**.

Mécanismes de sur-expression des gènes de détoxification

La **régulation** des gènes de détoxification en lien avec la résistance aux insecticides a été l'objet de plusieurs études. Impactant le plus souvent des P450s ou des GSTs, des modifications des régions *cis/trans* régulatrices chez les insectes résistants engendrent la sur-expression de ces gènes de détoxification. Chez *M. domestica* et *D. melanogaster*, une mutation dans la région *trans*-régulatrice des gènes CYP6A1, CYP6D1, CYP6A2 et CYP6A8 engendre la perte de fonction de ce promoteur et ainsi une hyper-transcription de ces gènes chez les individus résistants (Liu et Scott 1996; Maitra et al. 2000, 2002). Les mêmes gènes sont aussi fortement affectés par des mutations dans leurs régions *cis*-régulatrices chez les populations résistantes. Chez le moustique, peu d'études décrivent de tels mécanismes qui sont pourtant potentiellement présents à l'instar des autres insectes. Grant et Hammock (1992) ont montré l'implication d'un élément *trans*-régulateur dans la sur-expression d'une GST chez *Ae. aegypti*. Wilding et al. (2012) ont également mis en évidence que la présence d'un élément transposable (TE) correspondant à une partie du motif régulateur CuRE1 était fortement associé à la sur-expression de CYP9M10 dans une population de *C. quinquefasciatus* résistants à la perméthrine. CYP9M10 a bien été montré comme capable de métaboliser la perméthrine, mais l'implication fonctionnelle de ce TE dans la résistance a finalement été rejetée car la sur-expression du gène n'est pas altérée lors de sa suppression.

Les **récepteurs couplés aux protéines G** (GPCRs) sont impliqués dans les processus amonts de transcription en interagissant avec les signaux extracellulaires. Très peu d'études se sont intéressées à ce mécanisme en regard de la résistance aux insecticides. Néanmoins, une étude récente montre le rôle des GPCRs dans la modulation de l'expression de certains P450s associés à résistance à la perméthrine chez *C. quinquefasciatus* (Li et al. 2014).

La **multiplication du nombre de copies** d'un gène engendre souvent sa sur-expression par effet dosage (*gene dosage effect*, Kondrashov 2012). Ainsi l'augmentation du nombre de copie de certains gènes a rapidement été identifiée comme un mécanisme fréquent causant une résistance aux insecticides (Devonshire et Sawicki 1979). Les gènes codant pour

des estérases ont été les premiers décrits comme étant affectés par des amplifications en lien avec la résistance aux OPs, Carbs et PYRs avec notamment les estérases E4 chez *M. persicae* impliquées à la fois dans une bio-dégradation accrue de ces insecticides mais aussi dans leur séquestration (Devonshire 1977; Devonshire et Moores 1982). Ce mécanisme a aussi été décrit chez les moustiques *C. quinquesfasciatus* résistants aux OPs avec notamment l'amplification de deux gènes d'estérases (*Estα2* et *Estβ2*) impliquées dans la séquestration de l'insecticide (Vaughan et Hemingway 1995; Vaughan et al. 1997; Karunaratne et al. 1993). Un mécanisme similaire a aussi été identifié chez *Culex pipiens* en relation avec la résistance aux OPs (Labbe et al. 2007). Plus récemment, une amplification des gènes codants pour les estérases CCEAE3A et CCEAE6A en lien avec la résistance à l'OP téméphos a également été identifiée chez les moustiques *Ae. Aegypti* (Poupardin et al. 2014) et *Ae. albopictus* (Grigoraki et al. 2015). Ces phénomènes d'amplifications géniques associés à la résistance chez les insectes affectent ainsi principalement des estérases, mais des variations du nombre de copies de certains P450s ont également été décrites comme par exemple le rôle de l'amplification du gène *CYP9M6* dans la résistance d'*Ae. aegypti* aux PYRs (Kasai et al. 2014). Chez *An. funestus*, une duplication en tandem des gènes *CYP6P4* et *CYP6P9* apparaît aussi liée à la résistance aux PYRs (Wondji et al. 2009).

Complexité des mécanismes de résistance

Plusieurs mécanismes de résistance peuvent agir simultanément dans la même population d'insecte, aboutissant à de forts niveaux de **résistance** et rendant leur **compréhension difficile**. L'exemple de *CYP6A2* chez *D. melanogaster* combinant des mutations ponctuelles dans la séquence codante et une sur-expression liée à des modifications des régions *cis* et *trans* régulatrices illustre bien cette complexité (Dunkov et al. 1997; Maitra et al. 2000, 2002; Amichot et al. 2004). Il s'est ainsi écoulé près de 10 ans avant que les équipes de chercheurs s'intéressant à ce cas particulier en comprennent finement les mécanismes. Lorsque l'addition de ces mécanismes engendre des niveaux de résistance plus élevés que chacun de ces mécanismes séparément comme dans cet exemple, le terme de **résistance multiplicative** est employé (Hardstone et al. 2009).

Par ailleurs, un insecte peut développer une résistance face à plusieurs insecticides simultanément. Lorsqu'un même gène ou une mutation confère une résistance à plusieurs insecticides, le terme de **résistance croisée** est utilisé. Un tel phénomène est généralement observé pour des familles d'insecticides ayant les même modes d'actions, mais également

lorsqu'une même enzyme est capable de métaboliser différents insecticides de familles différentes (Lepoivre 2003). Ainsi, des populations d'*An. arabiensis* résistantes au DDT sont aussi résistantes aux PYRS (Nardini et al. 2013). De la même façon, des populations de thrips californien (*Frankliniella occidentalis*) résistantes au thiamethoxam sont aussi résistantes à de nombreux autres insecticides (imidaclothiz, dinotefuran, acetamipride et benzoate d'emamectine). Dans ce cas les mêmes enzymes sont impliquées dans la biodégradation de molécules ayant pourtant des modes d'action différents (Gao et al. 2014).

Le terme **résistance multiple** est quant à lui utilisé lorsque plusieurs mécanismes différents coexistent chez l'insecte et engendrent une résistance à plusieurs insecticides ayant des modes d'actions différents. Ainsi, des populations d'*An. gambiae* en Côte d'Ivoire présentent les deux mutations de cible *Kdr* et *Ace-I* leur permettant de résister à toutes les classes d'insecticides couramment utilisés en lutte anti-vectorielle : DDT, OPs, Carbs et PYRs (Edi et al. 2012).

Aujourd'hui, la résistance des espèces de moustiques d'importance sanitaire aux insecticides chimiques **menace** clairement l'avenir des programmes de **lutte anti-vectorielle**. En attendant l'implémentation à grande échelle de nouveaux moyens de contrôle des populations de vecteurs ou de nouveaux vaccins contre les maladies qu'ils transmettent, il apparaît essentiel de mieux comprendre ces mécanismes de résistance pour mieux les détecter dans les populations naturelles et mieux les gérer. **Jusqu'à aujourd'hui**, la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance a souvent été contrainte par les techniques disponibles et les **progrès** réalisés en **biologie moléculaire** offrent de nouveaux outils avec un **potentiel** important pour la **compréhension** de la résistance des moustiques aux insecticides.

III. *L'étude de la résistance aux insecticides au gré des progrès technologiques*

L'ère pré-biologie moléculaire

La recherche menée sur les mécanismes de résistance aux insecticides a, dans un premier temps, été essentiellement basée sur l'étude **biochimique** des enzymes impliquées dans ces mécanismes. Afin de caractériser le rôle et les activités de ces enzymes dans des populations d'insectes résistants, plusieurs approches biochimiques ont été utilisées.

L'utilisation d'**inhibiteurs** de ces enzymes comme par exemple S,S,S,-tributylphosphorotrithioate, le piperonyl butoxide et le diethyl maléate en tant qu'inhibiteur des estérases, des P450s et des GTS respectivement, a permis de mettre en évidence l'importance des enzymes de détoxification dans le phénotype de résistance de nombreux insectes en restaurant leur sensibilité. Afin de quantifier plus finement l'**activité** de ces enzymes en relation avec la résistance aux insecticides, des essais biochimiques à faible spécificité ont ensuite été mis au point pour les estérases, les GSTs et les P450s (Devonshire et al. 1986; Peiris & Hemingway 1990; WHO 1998). Une quantification plus spécifique des différentes enzymes nécessite alors l'utilisation de l'électrophorèse sur gel d'acrylamide (PAGE) puis d'un Western blot qui rend visible les différentes protéines ciblées par l'utilisation d'anticorps spécifiques. A cette période, le **métabolisme** des insecticides a également pu être étudié grâce à des protocoles d'incubation de l'insecticide en présence d'un extrait d'insecte (*in vitro*) ou de l'insecte vivant (*in vivo*). L'extrait obtenu est ensuite analysé par chromatographie, suivie éventuellement d'une technique analytique comme la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (El-Oshar et al. 1987).

Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La structure en **double hélice de l'ADN** a été décrite au début des années 1950, et ce n'est qu'à la fin des années 1980 que la première réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée et publiée. Dans le même temps sont mises au point les premières techniques de séquençage de l'ADN (Sanger et Gilbert). Ces inventions ont été un véritable bon en avant pour la biologie. Il fut alors possible d'**amplifier** des fragments de gènes puis de les cloner et de les séquencer afin d'accéder à l'information génétique et de tenter de la relier à un phénotype d'intérêt. Ce n'est que quelques années plus tard que ces techniques ont été appliquées au moustique, permettant alors d'amplifier par exemple les gènes codant pour les

cibles protéiques des insecticides puis de les **séquencer** afin de rechercher les **mutations** associées aux individus résistants. Ainsi, la mutation A302S du récepteur GABA a été décrite chez *Ae. aegypti* dans la résistance aux cyclodiènes, par homologie avec la drosophile (Thompson et al. 1993). Par la suite, les autres mutations de cibles précédemment décrites chez les insectes ont aussi été identifiées chez la plupart des espèces de moustiques (mutations *Kdr*, *Ace-1*) et ces recherches se poursuivent encore aujourd'hui quant au rôle des différentes mutations dans la résistance.

En parallèle, des **méthodes robustes et simples** de détection de ces mutations ont été mises au point. Depuis lors, le suivi spatio-temporel de la fréquence des mutations de cible est devenu un élément essentiel de l'étude de la résistance aux insecticides chez les moustiques. Les méthodes de détection reposent principalement sur l'utilisation de la PCR. Ainsi, une bonne connaissance des portions de gènes contenant les mutations de cible permet de déterminer facilement des amorces permettant d'amplifier ces zones génomiques, puis de rechercher les mutations après séquençage. Des amorces spécifiques de chaque mutation ont également été mises au point, se fixant sur l'ADN matrice uniquement si les mutations sont présentes, permettant ainsi une **détection diagnostique** de ces dernières (PCR allèle-spécifique, Saavedra-Rodriguez et al. 2007). Enfin, l'amplification des fragments porteurs de ces mutations par PCR quantitative en temps réel permet, par analyse de la courbe de dissociation haute résolution du produit PCR (Meltcurve) ou par hybridation de sondes spécifiques (TaqMan), de déterminer la présence ou non des mutations (Sarkar et al. 2011). Néanmoins, seules les mutations de cibles peuvent être facilement détectées par ces techniques et de tels marqueurs génomiques n'ont pas encore été identifiés pour les autres mécanismes de résistance.

« Quantitative trait *loci* » (QTL)

L'avènement de la génétique mendélienne, la théorie de l'évolution darwinienne bien ancrée et les avancées technologiques en biologie moléculaire ont contribué à l'essor de la **génétique quantitative**. Cette base théorique permet en pratique la détection de gènes ou de portions chromosomiques reliés à un trait phénotypique d'intérêt ; on parle alors de locus à caractère quantitatif, ou « quantitative trait *loci* » en anglais (QTL). Des marqueurs génomiques comme des SNPs¹⁰ ou des AFLPs¹¹ répartis dans tout le génome ou sur des zones

¹⁰ « Single Nucleotide Polymorphism », modification ponctuelle d'une seule base de la séquence d'ADN qui montre un polymorphisme entre plusieurs individus.

d'intérêt permettent d'obtenir des valeurs quantitatives sur la diversité allélique à de nombreux *loci*. L'analyse de la variance de cette diversité à un même locus entre groupes présentant une différence pour un trait phénotypique (comme par exemple résistant/sensible à un insecticide) permet de détecter des zones génomiques affectées par la sélection en lien avec le trait étudié.

Ainsi, des études basées sur la méthode des QTLs ont permis de mettre en évidence des gènes impliqués dans la résistance des moustiques *An. funestus* et *Ae. aegypti* aux PYRS et aux OPs (Wondji et al. 2007; Saavedra-Rodriguez et al. 2008; Reyes-Solis et al. 2014; Ranson et al. 2000b). Toutefois, cette technique nécessite de nombreux croisements génétiques, la sélection intense d'un phénotype et des analyses statistiques **fastidieuses**. Ainsi, bien qu'elle soit **efficace** pour la détection de gènes candidats à la résistance, peu d'études ont utilisé cette méthode pour l'adapter au moustique.

Le séquençage des génomes, une étape clé dans la recherche sur les vecteurs

Les moustiques vecteurs de maladies représentent un **enjeu sanitaire majeur**. Dans le but d'accélérer la recherche sur la résistance aux insecticides, de larges consortiums de recherches ont engagé un effort important au début des années 2000 pour **séquencer les génomes** des principaux moustiques vecteurs de pathogènes humains. En 2002, Holt et al. publient dans Science le premier génome complet de moustique (*An. gambiae*) puis Nene et al. celui d'*Ae. aegypti* en 2007 et Arensburger et al. celui de *C. quinquefasciatus* en 2010. L'annotation de ces génomes utilise plusieurs approches complémentaires (Brent 2005), comme la recherche *in silico* de sites fonctionnels connus (signaux d'épissages, codons d'initiation et de fin de transcription,...), la prédiction des gènes par comparaison avec le génome d'espèces proches comme *D. melanogaster* ou d'autres espèces de moustiques et enfin l'utilisation de données de séquençage du transcriptome. Ces bases de données de séquences annotées et partiellement assemblées ont amené à de nouvelles possibilités de recherches, permettant de disséquer des mécanismes moléculaires de plus en plus fins. L'amplification par PCR (classique ou quantitative) ainsi que le clonage et le séquençage d'un gène particulier deviennent alors plus aisés grâce à la facilité de déterminer des amorces spécifiques. Il est également possible de rechercher des homologies de séquences afin de mettre en relation les connaissances acquises chez différentes espèces. Enfin, la production de

¹¹ « Amplified fragment-length polymorphism », polymorphisme de longueurs de fragments du génome, digérés par des enzymes de restriction puis amplifiés, entre plusieurs individus.

protéines en système hétérologue et leur étude *in vitro* devient accessible, ouvrant la voie aux études de validation fonctionnelle (Frommer 1995).

Par la suite, les progrès des **techniques de biologie moléculaire** ont permis de mieux mettre à profit les génomes de moustiques, avec l'essor de nouvelles approches de screening moléculaire comme les **puces à ADN** et le **séquençage haut débit**. Ces approches « omiques » permettant l'étude simultanée d'un large ensemble de gènes ont ainsi rapidement été utilisées pour étudier la résistance des moustiques aux insecticides.

Puce à ADN (« DNA microarray »)

Une **puce à ADN** est un petit support de quelques centimètres carrés, généralement en verre traité, sur lequel sont fixées de courtes séquences d'acides nucléiques. Ces séquences, ou sondes, sont disposées sous forme de points, ou « spots » de quelques μm de diamètre, correspondant chacun à une portion d'un gène à étudier. Ensuite, l'ARN messager (ou l'ADNc) des échantillons à étudier auquel est incorporé des nucléotides fluorescents d'une (single color microarray) ou de plusieurs couleurs différentes (two color microarray) est hybridé à la puce à ADN. Dans le cas d'une puce à deux couleurs, on réalise une hybridation compétitive où la même quantité d'ADNc ou d'ARN de chacun des deux échantillons à comparer, chacun marqués d'une couleur différente, est mélangée. Après lavage des puces pour décrocher les fragments hybridés de manière non spécifique, les fragments de chaque échantillon sont ensuite détectés avec un scanner haute résolution. Après normalisation, le rapport de la fluorescence de chaque couleur de chaque spot de la puce témoigne de la quantité d'ADNc de chaque échantillon correspondant au gène représenté par ce spot, et donc à son niveau d'expression relatif (**Figure 11**). Cette technique a été très utilisée chez les moustiques pour identifier les gènes sur-exprimés dans les populations résistantes aux insecticides. La première puce créée dans ce but fût l'« **Anopheles detox chip** », ciblant plus de 190 gènes d'*An. gambiae* codant pour l'ensemble des enzymes de détoxification (David et al. 2005). Il y eu ensuite l'« **Aedes detox chip** » ciblant plus de 200 gènes de détoxification chez *Ae. aegypti* (Strode et al. 2008). Il existe actuellement des puces couvrant tout le transcriptome des différentes espèces de moustiques, permettant des études d'expressions sur tout le transcriptome simultanément. Malgré leur importante contribution aux avancées scientifiques, les puces à ADN présentent de **nombreux biais** techniques (biais d'amplification, de marquage, d'hybridation, de détection et de normalisation lors de la quantification relative). De plus, les puces à ADN classiquement utilisées en transcriptomique

ne sont pas capables de générer des données de polymorphisme, conduisant les scientifiques à se tourner vers les technologies de **séquençage à haut débit**.

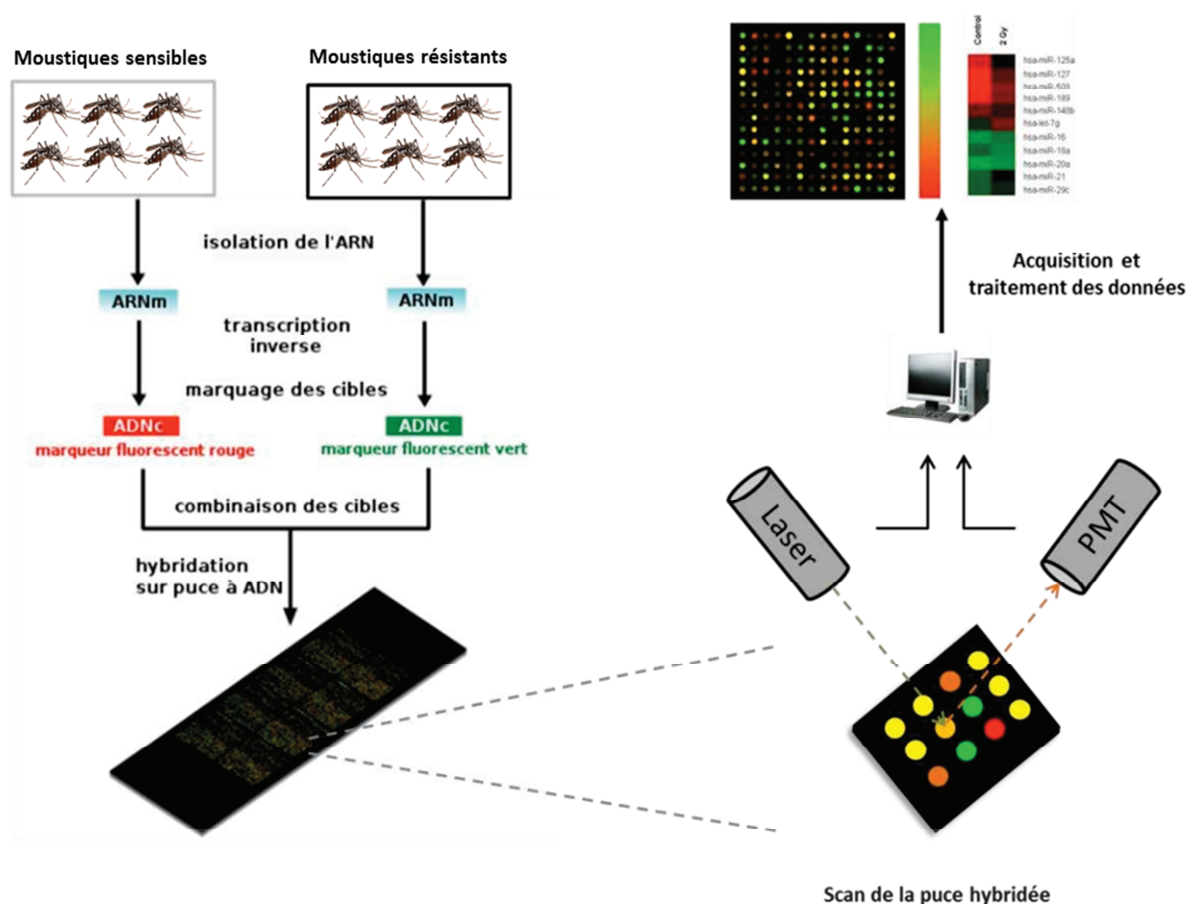


Figure 11 : Principe général du fonctionnement des puces à ADN d'expression (exemple d'hybridation avec deux fluorophores, adapté de la thèse de Poupardin 2011).

Séquençages à haut débit (Next-generation sequencing « NGS »)

Suite au séquençage des génomes, des approches transcriptomiques basées sur la technique d'« analyse en série de l'expression des gènes » (SAGE et longSAGE¹²) ont été développées. Cette technique basée sur le séquençage classique a ensuite été rapidement supplantée par une nouvelle génération de séquenceurs dits « à **haut débit** » apparus en 2005, opérant en parallèle sur un très grand nombre de séquences courtes, et atteignant ainsi des débits jusqu'à 1000 fois supérieurs au séquençage classique. On peut distinguer 3 techniques de séquençage à haut débit : le pyroséquençage (Roche), le séquençage par ligation (Applied

¹² « (long)Serial Analysis of Gene Expression », technique de simplification du transcriptome.

Biosystem) et le **séquençage à l'aide de terminateurs réversibles** (Illumina, aujourd'hui le plus répandu). Pour le séquençage Illumina (**Figure 12**), l'ADN est d'abord fragmenté en petits morceaux aux extrémités desquels sont liées des séquences adaptatrices. Les bibliothèques ainsi préparées sont ensuite fixées sur un support solide et chaque fragment est amplifié environ 1000 fois pour former des « clusters » ou regroupements clonaux qui seront séquencés en parallèle. À chaque cycle, l'ajout d'un nucléotide se traduit par l'émission d'un signal fluorescent associé à chacun des quatre nucléotides de l'ADN. Une caméra interprète alors le signal lumineux permettant ainsi au fil des cycles de reconstruire la séquence d'ADN. Cette méthode présente de nombreux avantages (Wang et al. 2009; Nagalakshmi et al. 2010) et permet de séquencer des millions de petites séquences (reads), généralement de 75 à 150 pb, en seulement quelques jours.

Ces techniques de séquençage peuvent ainsi être appliquées au séquençage de banques d'ADNc (technique de **RNA-seq**) sans simplification préalable du transcriptome (Wilhelm et Landry 2009; Mortazavi et al. 2008). Outre la quantification de l'expression par comptage des séquences obtenues pour chaque gène et pour chaque échantillon (mesure digitale de l'expression), l'approche RNA-seq permet aussi d'obtenir des données de polymorphisme couvrant les transcrits exprimés. De même, les techniques de séquençage haut débit peuvent être appliquées aux études génomiques en séquençant des **génomés entiers** (approches « whole genome »), de **portions de génome** (« targeted DNA-seq ») ou bien des **mélanges d'ADN** amplifiés par PCR. Enfin, il existe aujourd'hui aussi des approches NGS permettant de cibler les mécanismes liés aux **modification épigénétiques** de l'ADN (e.g. Methyl-seq et ChIP-seq) ou bien des approches de simplification des génomes permettant de génotyper de nombreux marqueurs génomiques simultanément chez un grand nombre d'échantillons (e.g. Rad-seq) qui sont souvent utilisées en **génomique des populations**.

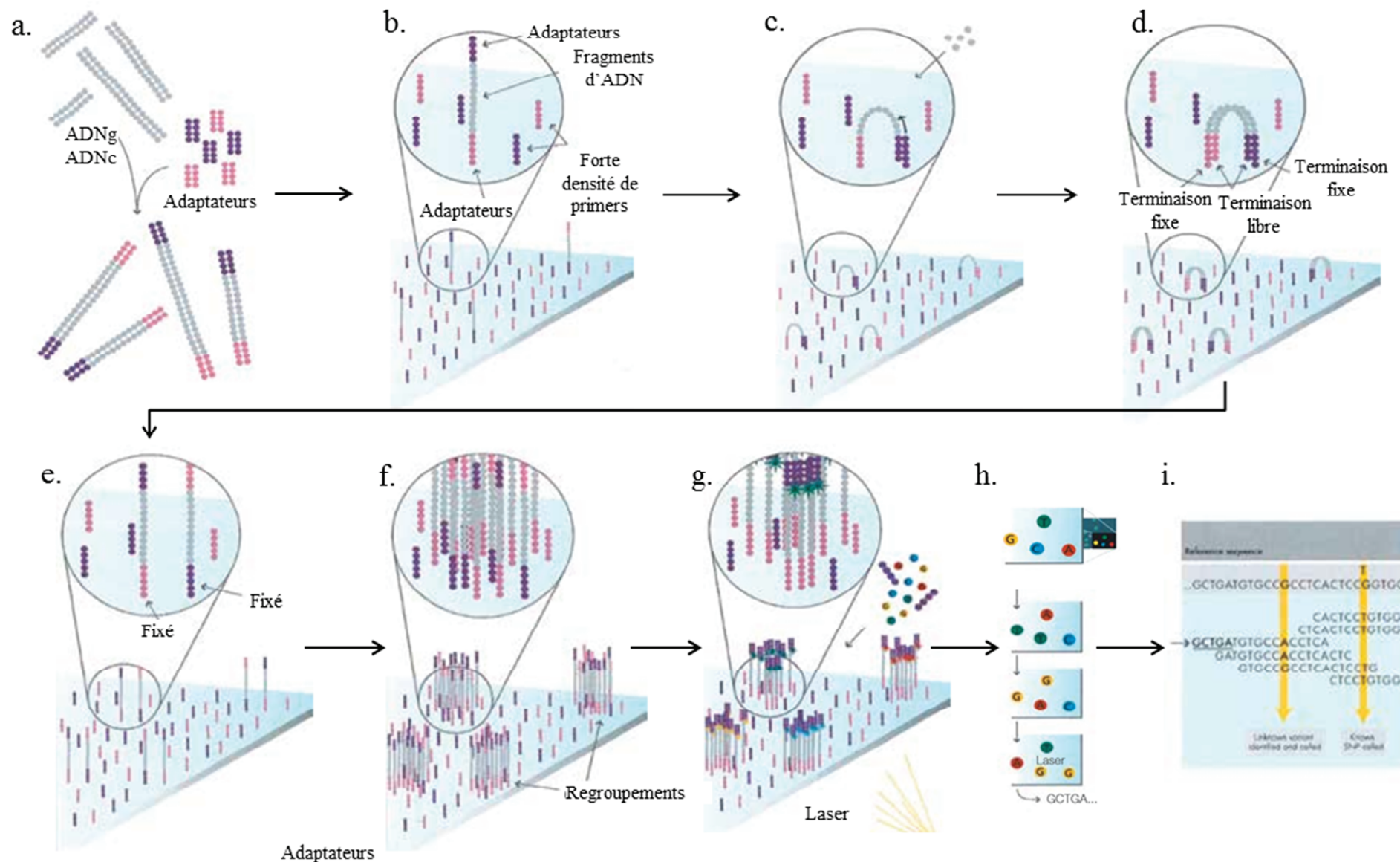


Figure 12: Principe de la technique de séquençage à haut débit Illumina. **a.** fragmentation de l'ADN et ligation des adaptateurs ; **b.** fixation des fragments simple brins sur la lame de verre ; **c.** amplification en pont ; **d.** obtention de brins doubles en pont sur la lame ; **e.** dénaturation afin de ne garder que des simples brins fixés sur la lame ; **f.** répétition des étapes d'amplification c, d et e et obtention de regroupements de brins d'ADN amplifiés ; **g.** début du séquençage par addition de nucléotides fluorescents lors de la polymérisation des brins amplifiés fixés ; **h.** lecture du signal fluorescent à chaque cycle et concaténation de la séquence ; **i.** alignement des séquences sur une séquence référence afin de détecter les variations de polymorphisme ou de quantifier l'expression.

Ces nouvelles techniques génèrent souvent des **quantités énormes de séquences** (1 million de nucléotides séquencés par seconde pour le Hi-seq, contre 1 million de nucléotides par jour pour le plus évolué des séquenceurs Sanger, qu'il faut ensuite pouvoir traiter par des outils **bio-informatiques**. Dans ce cadre, l'existence de génomes de moustiques séquencés et annotés facilite grandement l'analyse des résultats. Néanmoins, le traitement des données a représenté une limitation majeure de l'utilisation des techniques de NGS par les biologistes de par leur manque de formation en bio-informatique. Toutefois, ces outils se perfectionnent rapidement et deviennent de plus en plus **facilement accessibles aux biologistes**. Ainsi les améliorations techniques et logicielles ainsi que la diminution des coûts de séquençage (3 milliards \$ sur 13 ans pour le séquençage du génome humain en 2003 contre 1000\$ pour le séquençage d'un génome humain individuel en 3 jours actuellement) contribuent à la généralisation de l'utilisation des approches NGS en biologie.

Les progrès en biologie moléculaire ont permis la découverte de nombreux gènes candidats à la résistance métabolique chez le moustique. Toutefois, peu d'études ont utilisé le séquençage haut débit pour l'étude de la résistance chez le moustique, et des questions se posent quant à leur pertinence, leur efficacité sur du matériel biologique moustique ainsi que sur les possibilités d'analyse des données.

IV. Objectifs de la thèse

Contexte d'étude

Avec des **maladies** telles que le paludisme, la dengue et le chikungunya encore très meurtrières et devant le constat alarmant de l'envergure des phénomènes de résistance des moustiques aux insecticides, il paraît essentiel d'en comprendre les mécanismes sous-jacents afin de mieux gérer ces **résistances** sur le terrain. Ce travail a été amorcé par de nombreuses équipes de scientifiques de par le monde, et des découvertes considérables ont déjà été réalisées, comme notamment la caractérisation des mutations de cible et l'inventaire de nombreux gènes candidats à la résistance métabolique. Depuis quelques années, l'essor des **technologies** NGS permettent d'entrevoir de nombreuses opportunités pour approfondir les connaissances actuelles sur la résistance des moustiques aux insecticides. Dans ce contexte, **l'objectif de cette thèse** vise à mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la résistance aux insecticides pyréthrinoïdes chez le moustique *Aedes aegypti* par l'utilisation des techniques de **séquençage haut débit**. Ce travail est divisé en trois parties, chacune liée à une publication scientifique publiée (Chapitre II et III) ou bien en préparation (Chapitre IV). Cette thèse s'appuiera ainsi sur différentes études utilisant différentes approches NGS en vue d'évaluer leur potentiel dans l'étude de la résistance aux insecticides mais aussi de générer de nouvelles connaissances sur les mécanismes moléculaires responsables de la **résistance** des moustiques aux insecticides de la famille des **pyréthrinoïdes**.

1- Apports et limites du séquençage ARN haut débit pour l'étude de la résistance aux insecticides (Chapitre II).

Une **étude préliminaire** par RNA-seq a été conduite afin d'évaluer le potentiel des NGS dans l'étude de la résistance aux insecticides chez les moustiques. Les apports du RNA-seq peuvent être d'ordre quantitatif avec la recherche de gènes sur-exprimés en lien avec le phénotype de résistance, mais aussi qualitatifs car les données obtenues permettent de rechercher des variations de polymorphisme dans le transcriptome. Ainsi, une telle étude permet en théorie de détecter de nouveaux gènes candidats et de nouveaux mécanismes de résistance. Un comparatif entre différentes populations résistantes de fond génétique commun mais sélectionnées avec différents insecticides a été réalisé, permettant d'appréhender la **puissance de l'outil RNA-seq** à une échelle large aussi bien sur le nombre de gènes étudiés que sur les phénotypes de résistance. La population sélectionnée au PYR perméthrine

permettra notamment d'étudier finement les différents mécanismes moléculaires inhérents à la résistance à cette classe d'insecticides.

2- Etude des bases génomiques de la résistance à l'insecticide pyréthrianoïde deltaméthrine par enrichissement génomique et séquençage haut débit (Chapitre III).

Les gènes de détoxification surexprimés dans les populations résistantes représentent actuellement les seuls **marqueurs moléculaires** de la résistance métabolique chez les moustiques, mais leur suivi en routine dans les populations naturelles reste compliqué car ils reposent sur des analyses basées sur l'**ARN** (faible stabilité, variations d'expressions selon l'environnement et le statut physiologique des individus, selon les tissus, utilisation de mélanges d'individus ...). A l'opposé, l'identification de **marqueurs ADN** de la résistance métabolique faciliterait son suivi dans les populations naturelles grâce à une **conservation aisée** des échantillons (bonne stabilité de l'ADN), l'utilisation de **techniques simples** (PCR diagnostiques) et le **génotypage individuel** des marqueurs permettant l'estimation facile de leur fréquence dans les populations.

Il est théoriquement probable que des **modifications qualitatives** (mutations non-synonymes) affectant certaines enzymes de détoxification contribuent à une **meilleure dégradation** de l'insecticide mais cela a encore été peu étudié chez les moustiques. De même il a été démontré que des **variations du nombre de copies** des gènes peuvent contribuer à la résistance métabolique par **sur-expression** de certaines enzymes de détoxification (effet dosage). Ainsi, il apparaît que l'identification de marqueurs génomiques de la **résistance métabolique** revêt un intérêt majeur pour le suivi des différents mécanismes de résistance dans les populations naturelles, à l'image des mutations de cible. Se pose alors la question de l'identification de tels marqueurs, ainsi que de leur représentativité dans les populations naturelles de moustiques d'origines géographiques variées (universalité des marqueurs de résistance). Dans le but d'identifier de tels marqueurs génomiques, une étude par **DNA-seq ciblée** sur un large ensemble de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux insecticides a été réalisée, sur plusieurs populations de moustiques d'origines géographiques variées et résistantes au PYR deltaméthrine. La forte profondeur de séquençage d'une telle étude vise à quantifier avec une grande précision les variations de **polymorphisme** et de détecter des **variations du nombre de copies** affectant ces gènes en lien avec la résistance.

3- Etude des bases moléculaires de la résistance aux pyréthriinoïdes par combinaison des techniques de DNA-seq et de RNA-seq (Chapitre IV).

De nombreux gènes de détoxification semblent impliqués dans la résistance métabolique. Ils sont alors surexprimés dans les populations résistantes par rapport aux populations sensibles. Cependant, peu d'études décrivent les mécanismes moléculaires à **l'origine de ces sur-expressions**. Il s'agit ici de **croiser des données de séquençage** issues de l'étude **par DNA-seq ciblé** avec de nouvelles données issues d'une étude par **RNA-seq** sur les mêmes échantillons biologiques. Ainsi, les variations du **nombre de copies** de gènes en lien avec la résistance pourront par exemple être reliées à l'expression différentielle des gènes chez les populations résistantes. De même, les variations de **polymorphisme des régions cis-promotrices** obtenues par DNA-seq pourront aussi être reliées aux profils d'expression des gènes obtenus par RNA-seq afin de tenter d'identifier les éléments régulateurs contrôlant la sur-expression de certains gènes de détoxification chez les populations résistantes. Ces expériences, les questions auxquelles elles prétendent répondre ainsi que leurs interconnexions sont présentées de manière schématique par la **Figure 13**.

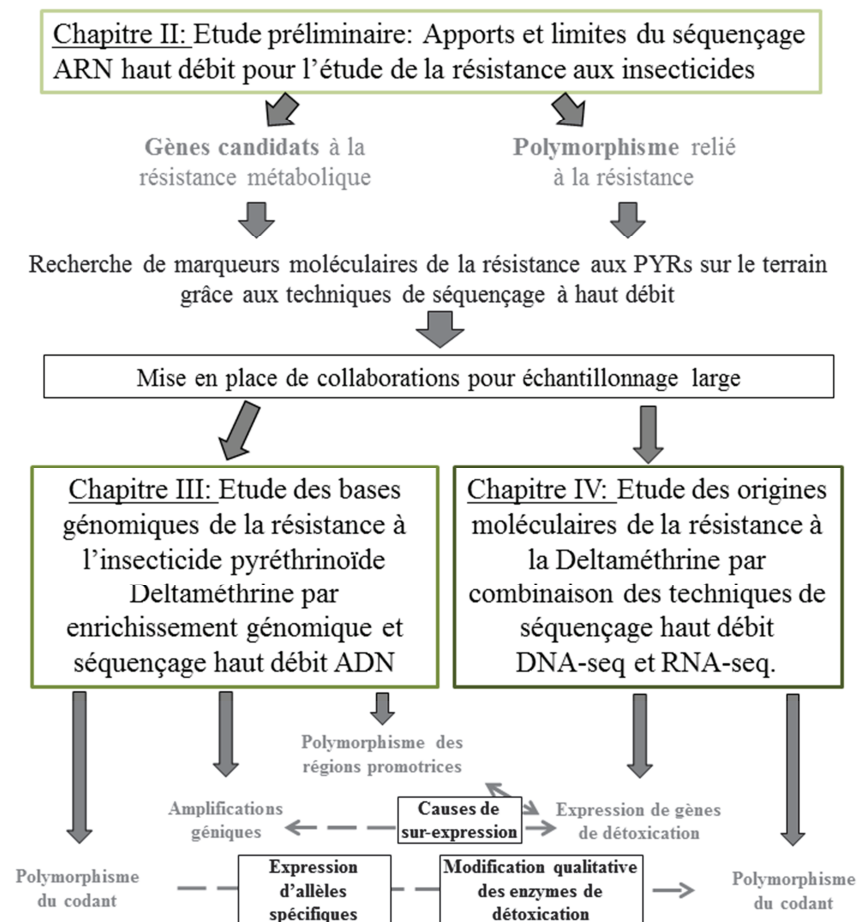


Figure 13 : Objectifs de la thèse et inter-connexions entre les différents chapitres.

Enfin, une **synthèse** de l'ensemble des résultats obtenus permettra d'acquérir de nouvelles connaissances sur les bases génétiques de la résistance aux PYRs chez les moustiques en vue de développer le panel de **marqueurs diagnostiques** de la résistance utilisables à grande échelle sur le terrain.

Modèle biologique et insecticides étudiés

Le **modèle biologique** utilisé dans le cadre de cette thèse est le moustique *Aedes aegypti*, principal vecteur de la fièvre jaune et de la dengue, mais aussi du chikungunya et du virus Zika (Mackenzie et al. 2004; Jansen et Beebe 2010; Diallo et al. 2014; Vega-Rua et al. 2014). Sa capacité vectorielle envers des maladies ré-émergentes comme la dengue ou bien le chikungunya en fait une **espèce d'intérêt sanitaire** très important. Les différentes populations étudiées sont maintenues en laboratoire, à une température de 28°C, 70% HR et un cycle jour/nuits de 14h/18h. Les principaux atouts de cette espèce comme modèle d'étude concernent sa **facilité d'élevage** (temps de génération court, possibilité de conserver les œufs pendant plusieurs mois) et le fait que son **génome** soit entièrement séquencé et annoté (Nene et al. 2007). Le génome d'*Ae. aegypti* est 5 fois plus grand que celui d'*An. gambiae* avec près de 1.4 milliards de paires de bases. L'assemblage de ce génome a abouti à la détection de 17578 gènes (8848 annotés) et 18841 transcrits répartis en 1688 supercontigs¹³ (634 physiquement cartographiés sur les 3 chromosomes de façon unanime par Timoshevskiy et al. 2014 et Juneja et al. 2014).

De plus, les mécanismes de **résistance** de ce moustiques sont **moins bien connus** que chez *A. gambiae* et *C. quinquefasciatus* alors qu'il occupe une place majeure en santé publique. Cette thèse nous a amenée à utiliser des échantillons d'*A. aegypti* d'origines variées : des populations de laboratoire maintenues et sélectionnées au LECA¹⁴ Grenoble et des populations de terrain issues de collaborations diverses, avec notamment Rodolphe Poupardin (LSTM¹⁵), l'UMR MIVEGEC¹⁶ basée en Thaïlande et l'Institut Pasteur de Guyane (**Tableau 4**).

¹³ Les supercontigs sont des entités génomiques regroupant plusieurs contigs, orientés et ordonnés selon leurs liens physiques. Un contig est une entité regroupant de manière ordonnée plusieurs gènes ayant également un lien physique entre eux.

¹⁴ Laboratoire d'Ecologie Alpine

¹⁵ Liverpool School of Tropical Medicine

¹⁶ Unité Mixte de Recherche Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique et Contrôle.

Nom	Nom complet	Origine	Historique	Résistance étudiée	Niveau de résistance (DL50 Deltaméthrine %)
LivpS	Liverpool (génome)	Afrique de l'ouest	Laboratoire, colonisée en 1930s	Deltaméthrine	Sensible (0,001%)
BoraS	Bora-Bora	Polynésie française	Laboratoire, colonisée en 1990s	Deltaméthrine, Permethrine, Propoxur, Imidaclopride	Sensible (0,001%)
DeltaR	Deltaméthrine R	Polynésie française	Bora bora sélectionnée au LECA Grenoble	Deltaméthrine	Peu résistante (0,005%)
PropoR	Propoxur R	Polynésie française	Bora bora sélectionnée au LECA Grenoble	Propoxur	n.c.
PermR	Permethrine R	Polynésie française	Bora bora sélectionnée au LECA Grenoble	Permethrine	n.c.
ImidaR	Imidaclopride R	Polynésie française	Bora bora sélectionnée au LECA Grenoble	Imidaclopride	n.c.
PatgS	Patthalung	Sud de la thailande	Laboratoire, colonisée en 2013	Deltaméthrine	Sensible (0,001%)
PhetR	Phetchaburi	Bangkok	Terrain, collectée en 2013	Deltaméthrine	Résistante (0,25%)
NakhR	Nakhon Sawan	Centre Thaïlande	Terrain, collectée en 2013	Deltaméthrine	Résistante (0,25%)
NwOrS	New Orleans	Louisiane	Laboratoire, colonisée en 1980s	Deltaméthrine	Sensible (0,001%)
CaynR	Cayenne	Guyane française	Terrain, collectée en 2013	Deltaméthrine	Très résistante (0,75%)
StGeR	St-Georges de l'Oyapock	Guyane française	Terrain, collectée en 2013	Deltaméthrine	Très résistante (0,75%)

Tableau 4: Récapitulatif des populations de moustique utilisées dans cette thèse.

D'un point de vue **pratique**, j'ai participé à l'**échantillonnage** sur le terrain d'une partie de ces populations et de leur **élevage** au laboratoire (après réception des œufs par les différents partenaires). J'ai également fabriqué les papiers imprégnés de deltaméthrine et mis au point la méthode de **sélection** et de **phénotypage** des adultes (Publication II). Le **séquençage** des Publications II et III a été réalisé par la compagnie Hybrigenics-Helixio (Clermont-Ferrand, France), incluant la préparation des libraires jusqu'à l'envoi des séquences. Le reste des manipulations de **biologie moléculaire** ont été réalisées par Thierry Gaude et moi-même au LECA.

Chapitre II:

Apports et limites du séquençage ARN haut débit (RNA-seq) pour l'étude de la résistance aux insecticides

I. Contexte scientifique

Le **séquençage** et l'**annotation des génomes** de plusieurs espèces de moustiques depuis 2002 (Holt et al. 2002; Nene et al. 2007; Arensburger et al. 2010) disponibles sur les bases de données publiques telles que Vectorbase (Megy et al. 2012) ou Ensembl ont contribué au développement d'outils moléculaires à haut débit applicables à l'étude des mécanismes de résistance aux insecticides. Ces nouveaux outils ont permis de réaliser des criblages moléculaires couvrant un très grand nombre de gènes et donc d'identifier **les gènes impliqués dans la réponse des moustiques aux insecticides** sans *a priori*. Les puces à ADN ont ainsi représenté un véritable bond en avant dans la recherche sur la résistance des moustiques aux insecticides, mais cette technique présente tout de même des biais et des limites. Après la mise au point des premières techniques de séquençage haut débit comme le DEGTP-seq, des améliorations techniques sont rapidement implémentées. Le **RNA-seq** (séquençage ARN, développé par Illumina et détaillé en introduction) tel qu'on le connaît voit alors le jour en 2005, représentant une alternative de choix aux puces à ADN.

II. Objectifs de l'étude et approches utilisées

Cette étude, initiée en 2010, visait à appliquer pour la **première fois** la technique de RNA-seq pour étudier les bases moléculaires de la résistance aux insecticides chez les moustiques. Ce travail nous a permis d'évaluer la puissance de cette technique (par rapport notamment aux puces à ADN) pour étudier la réponse adaptative des moustiques à différents types d'insecticides chimiques. Cette réponse adaptative a été évaluée sous l'angle de l'analyse de l'**expression différentielle** des gènes et des **variations de polymorphisme** liées aux phénotypes de résistances. Des mutations ponctuelles ont déjà été reliées à la résistance des moustiques aux insecticides, comme par exemple celles affectant les gènes codants pour les cibles des insecticides ou pour certaines enzymes de détoxification (Hemingway et al. 2004;

Chiu et al. 2008; Hardstone et al. 2010; Wondji et al. 2009; Riveron et al. 2014). Néanmoins, aucune étude avant cette publication n'avait porté sur l'étude des mutations ponctuelles pouvant être impliquées dans la résistance aux insecticides à l'échelle du transcriptome.

Cette étude a porté sur 4 populations génétiquement proches du moustique *Ae. aegypti*. La population « parentale » sensible Bora-Bora a été sélectionnée au stade larvaire par 3 insecticides de différentes familles (le pyrethroïde **perméthrine**, le carbamate **propoxur** et le néonicotinoïde **imidaclopride**) pendant 10 générations afin d'obtenir 3 populations « filles », chacune résistantes à l'insecticide utilisé (respectivement Perm-R, Propo-R et Imida-R) (**Figure 14**). Ces populations ne présentent pas de mutations de cible et ont toutes le même fond génétique ; les modifications transcriptomiques détectées seront alors finement comparables et découleront principalement de la **résistance métabolique** aux insecticides étudiés.

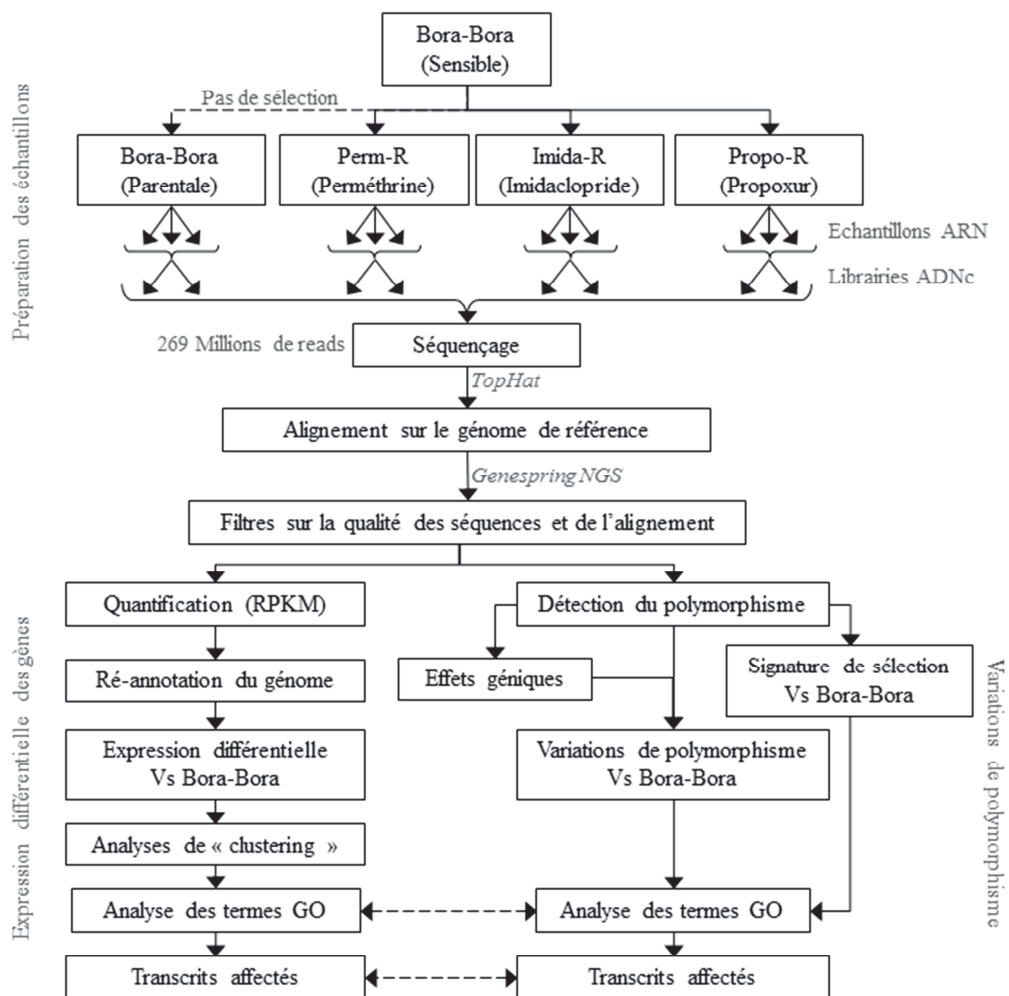


Figure 14: Organigramme de l'étude aboutissant à la Publication I.

Après 10 générations de sélection, des bioessais ont été réalisés sur ces populations afin d'évaluer leurs niveaux de résistance constitutive à chaque insecticide, puis 3 lots de 60 larves de stade 4 par population ont été échantillonnés. Les ARNs totaux ont été extraits de ces échantillons, puis regroupés à quantité d'ARN égales afin d'obtenir un mélange représentatif de 180 individus. Deux libraires d'ADNc ont été préparées pour chaque population puis séquencées sur un Genome Analyzer II (Illumina) sous forme de fragments de 75 pb. Après application de filtres de qualité et alignement des séquences obtenues sur le génome de référence d'*Ae. Aegypti* (Aaegl1), une analyse d'expression différentielle (Figure 15) ainsi qu'une analyse de polymorphisme (**Figure 16**) ont été effectuées. Les résultats de cette étude sont présentés dans la **Publication I** annexée à la fin du chapitre II.

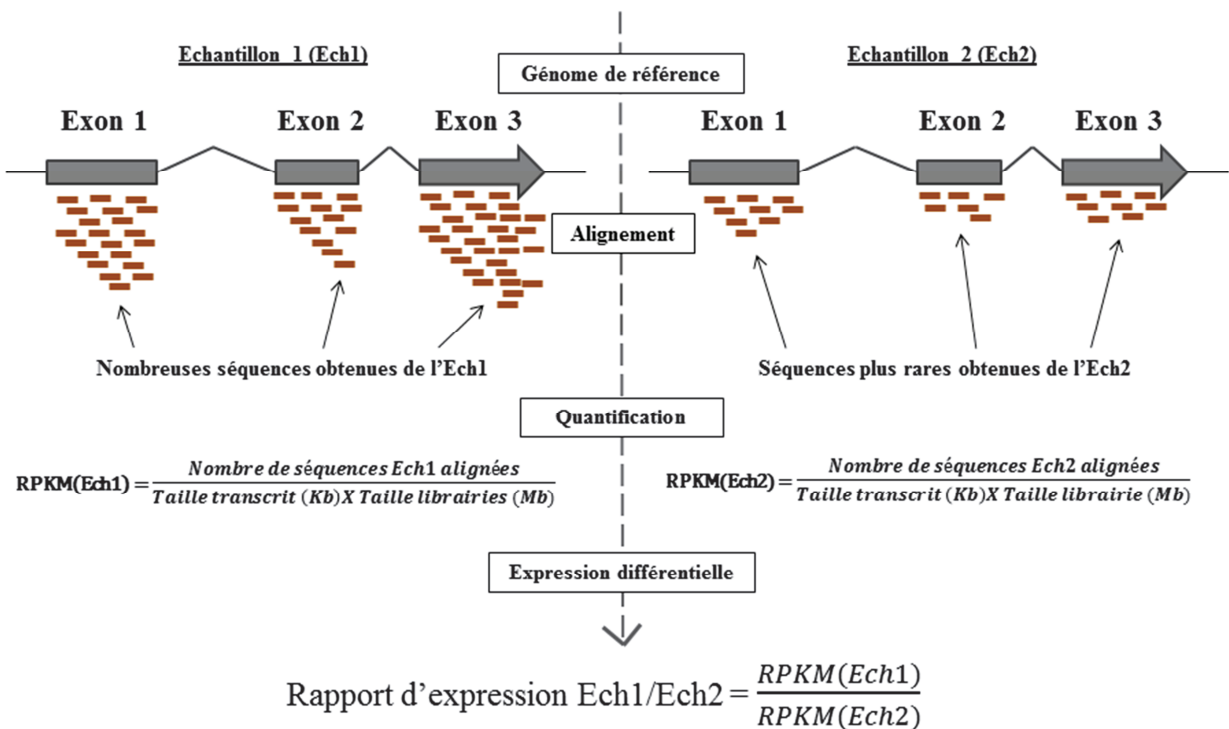


Figure 15: Schéma du principe de quantification de l'expression d'un transcrit par RNA-seq.

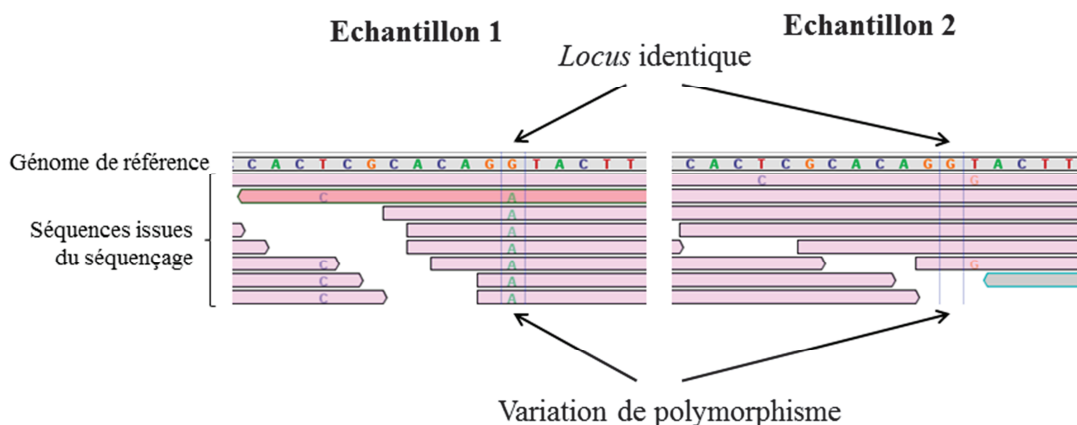


Figure 16: Schéma du principe de détection des variations de polymorphisme.

III. Discussion des principaux résultats

Apports et limites de l'outil RNA-seq

De façon générale, cette première étude a montré que le **RNA-seq** semble être un outil très **bien adapté** à l'étude de la résistance du moustique aux insecticides. Malgré l'absence de réplicats biologiques dans cette étude liée au coût de séquençage encore élevé à cette époque, les librairies ont été séquencées de façon reproductible et sont représentatives d'un grand nombre d'individus. La plupart des transcrits sont détectés et la couverture de séquençage obtenue (>0.5 RPKM par condition) permet d'évaluer de manière robuste le **niveau d'expression** de la majorité de ces transcrits. Par contre, les gènes non détectés dans une des conditions (RPKM <0.5) n'ont pas été pris en compte et les transcrits exprimés dans certains échantillons seulement ne sont pas étudiés. L'application de filtres de qualités stringents permettent d'obtenir des **données fiables**. Contrairement aux puces à ADN, les données obtenues par RNA-seq ne présentent pas de biais d'hybridation croisée engendrant un bruit de fond ni de saturation en cas de niveau d'expression élevé; les rapports d'expressions calculés sont alors plus fiables qu'avec les puces à ADN malgré la forte amplitude des niveaux d'expression et apparaissent cohérents du fait qu'une faible proportion (moins de 2%) des gènes différentiellement exprimés entre conditions appartient à des catégories de gènes domestiques, dont l'expression n'est effectivement pas censée varier. Enfin, les données générées par le RNA-seq ont permis de ré-annoter certains transcrits, de détecter de nouveaux transcrits mais aussi d'identifier les événements de transcription alternative entre conditions ce qui n'est pas accessible avec les données issues des puces à ADN.

Contrairement aux puces à ADN, la technique de RNA-seq permet également d'avoir une vue d'ensemble des **variations de polymorphisme** à l'échelle du transcriptome. Néanmoins, la capacité de détecter des variations et d'estimer correctement leur fréquence dépend de la profondeur de séquençage qui n'est pas homogène entre les transcrits car elle dépend de leur niveau d'expression. Afin d'obtenir des données exploitables et fiables il est ainsi apparu pertinent d'appliquer des filtres assez stringents sur la qualité des bases séquencées ainsi que sur le niveau de couverture de séquençage en amont de la détection des variations de polymorphisme. De plus un biais potentiel lié à l'expression d'allèles

spécifiques¹⁷ n'est pas à exclure (Bell et Beck 2009). Ce point sera traité plus en détail dans le Chapitre IV.

Alors que le **coût** du séquençage haut débit devient de plus en plus **abordable** et intéressant par rapport à celui des puces à ADN (env. 600 euros / échantillon pour >30 M reads de 100 pb en RNA-seq), une des limitations majeures de l'approche RNA-seq concernait initialement le traitement des séquences par le développement et l'utilisation d'outils bio-informatiques dédiés. A l'heure actuelle, de nombreux outils d'analyse se sont développés, adoptant une interface de plus en plus accessible au biologiste. Dans ce contexte, la présente étude nous a permis d'acquérir ces compétences au laboratoire en se familiarisant avec l'utilisation de **solutions bio-informatiques** commerciales (Genespring NGS¹⁸) ou libres de droits (plateforme Galaxy¹⁹).

Ainsi, l'approche transcriptomique par RNA-seq représente clairement un outil très puissant pour l'étude de l'adaptation des moustiques à leur environnement. En plus d'estimer de manière robuste les niveaux d'expression, il est possible d'avoir un très bon aperçu global des variations de polymorphisme dans les transcrits en réponse à la sélection à un insecticide pour un rapport coût/efficacité intéressant. Pour la suite, il apparaît essentiel d'approfondir les résultats obtenus à l'aide de techniques de séquençage d'ADN génomique.

Les gènes candidats à la résistance

Profils généraux

Les bioessais effectués sur des lots de larves des populations sélectionnées ont montré une augmentation modérée des niveaux de résistance constitutive des trois populations Perm-R, Propo-R et Imida-R (~4 fois, ~2 fois et ~6 fois respectivement) par rapport à leur population sensible parente. Il ressort de notre étude des profils d'expression divergents entre populations résistantes. La population Imida-R, sélectionnée avec l'imidaclopride et montrant le niveau de résistance le plus élevé, présente la plus forte réponse en terme de transcription différentielle avec de **nombreux gènes sur-exprimés** par rapport à la population sensible Bora-Bora. La population Perm-R quant à elle montre peu de gènes différentiellement transcrits en réponse à la sélection avec la perméthrine, mais de **fortes variations de**

¹⁷ Des mécanismes *cis*- et ou *trans*-régulateurs peuvent entraîner l'expression différentielle des différents allèles d'un même gène. Ainsi, les fréquences alléliques déterminées à l'aide de données RNA-seq peuvent être influencées par ce phénomène, et être différentes des fréquences génomiques.

¹⁸ Maintenant commercialisé sous le nom de Stand NGS, ce logiciel développé par Agilent permet de traiter des données de séquençage haut débit ou de puces à ADN.

¹⁹ Plateforme en ligne d'outils bio-informatiques. <https://usegalaxy.org/>

polymorphisme. Enfin, la population Propo-R présente une réponse intermédiaire suite à la sélection avec le propoxur. Ces spécificités transcriptomiques quantitatives et qualitatives suggèrent des stratégies adaptatives et des mécanismes de résistance différents selon l'insecticide utilisé pour la sélection.

Les principales modifications transcriptomiques en réponse à la sélection par les insecticides affectent les gènes impliqués dans la détoxification, la synthèse de la cuticule le transport et la réponse immunitaire. Certains transcrits codant pour des gènes de la réponse immunitaire sont sous exprimés ou affectés par des SNPs différentiels chez toutes les populations résistantes. Ces gènes sont potentiellement impliqués dans la réponse du moustique aux infections parasitaires ou virales (Luplertlop et al. 2011; Dimopoulos 2003) et leur sous-expression peut affecter la capacité vectorielle des moustiques résistants, impactant par exemple négativement le contrôle des maladies (Alout et al. 2013; Rivero et al. 2010).

Des gènes codants pour des protéines cuticulaires apparaissent affectés par la sélection avec les différents insecticides, plus particulièrement avec l'imidaclopride. La cuticule constitue la première barrière de défense du moustique face aux insecticides, et des modifications de celle-ci ont été suspectées d'avoir un rôle dans la résistance (Wood et al 2010). Ces gènes sont ainsi principalement affectés par des sur-expressions suggérant un lien entre la résistance et la sur-production de protéines cuticulaires plutôt qu'avec des modifications structurales de ces dernières. De nombreux transporteurs cellulaires comme des hexamerines ont également été retrouvés sur-exprimés ou affectés par des variations de polymorphisme, notamment en réponse à la sélection avec la perméthrine. Bien que ces protéines soient majoritairement impliquées dans le stockage et le transport d'acides aminés (Burmester 1999), elles ont la capacité de se lier aux molécules insecticides (Haunerland et Bowers 1986), suggérant un rôle possible dans le transport et/ou la séquestration des insecticides comme le pyréthrianoïde perméthrine.

Sur-expression des gènes de détoxification

Parmi les gènes différentiellement transcrits entre populations sélectionnées et populations sensibles, nombre d'entre eux codent pour des **enzymes de détoxification**. Parmi les gènes candidats identifiés, *CYPBB2* apparait fortement surexprimé dans les populations Imida-R et Propo-R mais également légèrement dans la population Perm-R. Ce gène a déjà été décrit comme solide candidat à la résistance à l'imidaclopride (Riaz et al. 2013), ainsi que capable de métaboliser la perméthrine chez *C. quinquesfasciatus* (Kasai et al. 2014). Des

phénomènes de résistance croisée entre le néonicotinoïde imidaclopride et le carbamate propoxur ont déjà été identifiés (Riaz et al 2013), et le P450 CYP6Z8 apparaît surexprimé dans les deux populations Imida-R et Propo-R. De manière intéressante, ses homologues CYP6Z1 et CYP6Z2 chez *An. gambiae* ont été validés comme métabolisant respectivement l'organochloré DDT et le carbamate Carbaryl (Chiu et al. 2008). Étonnamment, aucun des gènes validés dans le phénotype de résistance aux PYRS n'a été retrouvé sur-exprimé ou affecté par des variations de polymorphisme dans la population Perm-R. Le faible niveau de résistance de la population Perm-R ou le fait que la sélection ait été effectuée au stade larvaire alors que les gènes validés ont été détectés dans des moustiques adultes peuvent expliquer une telle observation. De plus, la sélection a été réalisée avec la perméthrine (Type I) et non la deltaméthrine (Type II). Enfin, les mécanismes entraînant la surexpression comme les duplications de gènes ne sont peut-être pas présents dans la population sensible parente Bora Bora, nécessitant d'autant plus de générations de sélection pour atteindre des niveaux d'expression significativement plus élevées. Ces différentes observations amènent ainsi à se poser la question du **réalisme** de cette étude par rapport à la réalité du terrain.

Variations de polymorphisme au sein des gènes de détoxification

Les **variations de polymorphisme** des gènes potentiellement impliqués dans la résistance des moustiques aux insecticides ont été peu décrites dans la littérature (Hemingway et al. 2004; Chiu et al. 2008; Hardstone et al. 2010; Wondji et al. 2009; Riveron et al. 2014) car la majorité des études se sont focalisées sur les mutations au niveau des cibles des insecticides ou sur la sur/expression des enzymes de détoxification. Toutefois, ce mécanisme est impliqué dans la résistance d'autres insectes (Li et al 2007) et nos données suggèrent clairement leur rôle dans la résistance des moustiques. Les **gènes de détoxification** sont les plus impactés par ces variations, plus particulièrement en réponse à la sélection au PYR perméthrine avec de nombreux P450s affectés. Une trace de sélection importante a ainsi été détectée sur des gènes codant pour des P450s appartenant aux familles des CYP6Zs, CYP6Ms et des CYP6Ns. Les familles des CYP6Zs et CYP6Ms ont souvent été reliées à la résistance aux PYRS (Chandor-Proust et al. 2013; Stevenson et al. 2011; Mitchell et al. 2012), suggérant leur rôle prépondérant dans la résistance métabolique.

Conclusions

Cette étude préliminaire confirme la puissance des techniques de séquençage haut débit comme le RNA-seq pour l'étude des mécanismes de résistance des moustiques aux

insecticides. Les données d'expression différentielles obtenues apparaissent très robustes bien qu'elles ne soient pas forcément réalistes par rapport aux populations naturelles (populations de laboratoire sélectionnées au stade larvaire et présentant des niveaux de résistance faibles). Une comparaison entre les mécanismes identifiés ici et ceux détectés en populations naturelles sera effectuée dans les parties suivantes (Chapitres III et IV). Enfin, les données de polymorphismes obtenues ont représenté une avancée majeure dans le domaine par la publication du premier jeu de données global de polymorphisme en lien avec la résistance aux insecticides chez les moustiques. Ces données confirment le rôle du polymorphisme des enzymes de détoxification dans la résistance des moustiques aux insecticides, plus particulièrement vis à vis des pyréthriinoïdes. Ce point sera approfondi plus finement dans le Chapitre III. Par ailleurs, il semble également intéressant de rechercher les facteurs génétiques qui contrôlent la sur-expression des enzymes de détoxification (amplifications géniques et/ou modifications *cis*-régulatrices, Chapitres III et IV). Ces facteurs représentent d'importants marqueurs ADN de la résistance métabolique, encore inconnus mais essentiels pour un meilleur suivi de la résistance dans les populations de moustique.

Publication I:

Titre: Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing.

Auteurs: Jean-Philippe David, Frédéric Faucon, Alexia Chandor-Proust, Rodolphe Poupardin, Muhammad Asam Riaz, Aurélie Bonin, Vincent Navratil et Stéphane Reynaud.

Année de publication : 2014

Journal de publication : BMC Genomics n° 15

Contribution personnelle : j'ai participé à l'analyse des résultats, à la mise en place et à l'optimisation des méthodes d'analyse de séquences. Cette publication déjà en cours à mon arrivée en thèse m'a ainsi permis de m'initier au séquençage haut débit et aux outils d'analyse de séquence. Je me suis également basé sur cette étude préliminaire afin de mettre en place les différentes approches plus centrales de ma thèse développées dans les Chapitres III et IV.

Publication I :

Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing

Jean-Philippe David^{1,2,3*}, Frédéric Faucon^{1,2,3}, Alexia Chandor-Proust^{1,2,3}, Rodolphe Poupardin^{1,2,3,4}, Muhammad Asam Riaz^{1,2,3,5}, Aurélie Bonin^{1,2,3}, Vincent Navratil⁶ and Stéphane Reynaud^{1,2,3}

Abstract

Background: Mosquito control programmes using chemical insecticides are increasingly threatened by the development of resistance. Such resistance can be the consequence of changes in proteins targeted by insecticides (target site mediated resistance), increased insecticide biodegradation (metabolic resistance), altered transport, sequestration or other mechanisms. As opposed to target site resistance, other mechanisms are far from being fully understood. Indeed, insecticide selection often affects a large number of genes and various biological processes can hypothetically confer resistance. In this context, the aim of the present study was to use RNA sequencing (RNA-seq) for comparing transcription level and polymorphism variations associated with adaptation to chemical insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*. Biological materials consisted of a parental susceptible strain together with three child strains selected across multiple generations with three insecticides from different classes: the pyrethroid permethrin, the neonicotinoid imidacloprid and the carbamate propoxur.

Results: After ten generations, insecticide-selected strains showed elevated resistance levels to the insecticides used for selection. RNA-seq data allowed detecting over 13,000 transcripts, of which 413 were differentially transcribed in insecticide-selected strains as compared to the susceptible strain. Among them, a significant enrichment of transcripts encoding cuticle proteins, transporters and enzymes was observed. Polymorphism analysis revealed over 2500 SNPs showing > 50% allele frequency variations in insecticide-selected strains as compared to the susceptible strain, affecting over 1000 transcripts. Comparing gene transcription and polymorphism patterns revealed marked differences among strains. While imidacloprid selection was linked to the over transcription of many genes, permethrin selection was rather linked to polymorphism variations. Focusing on detoxification enzymes revealed that permethrin selection strongly affected the polymorphism of several transcripts encoding cytochrome P450 monooxygenases likely involved in insecticide biodegradation.

Conclusions: The present study confirmed the power of RNA-seq for identifying concomitantly quantitative and qualitative transcriptome changes associated with insecticide resistance in mosquitoes. Our results suggest that transcriptome modifications can be selected rapidly by insecticides and affect multiple biological functions. Previously neglected by molecular screenings, polymorphism variations of detoxification enzymes may play an important role in the adaptive response of mosquitoes to insecticides.

Keywords: RNA sequencing, RNA-seq, Insecticide resistance, Mosquito, Dengue, Detoxification enzymes, Cytochrome P450 monooxygenase, CYP, Cuticle, Transporters

* Correspondence: jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr

¹Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR CNRS 5553, Grenoble, France

²Université Grenoble Alpes, Grenoble, France

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Mosquitoes are vectors of several human diseases representing a major burden for public health worldwide [1]. Half of the world's population is exposed to malaria while dengue fever represents a burden in over 100 countries with 2.5 billion people at risk [2,3]. Since the 1950s, chemical insecticides have been massively used for controlling mosquito populations but their efficacy is now threatened by resistance mechanisms developed by insects. In absence of efficient alternatives, characterizing molecular mechanisms underlying resistance is a key step for improving resistance management strategies.

Resistance to insecticides can be the consequence of different mechanisms, such as a mutation of the proteins targeted by the insecticide (target-site insensitivity), a lower penetration of the insecticide, its sequestration, or its biodegradation (metabolic resistance) [4,5]. Target-site insensitivity and metabolic resistance are known as the two main resistance mechanisms in mosquitoes [4,6]. Mutations causing target-site insensitivity are well-characterized in mosquitoes and molecular tests detecting these mutations are available for species of public health importance [7-12]. Metabolic resistance has been reported worldwide and usually involves detoxification enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases (P450s or CYPs for genes), carboxy/cholinesterases (CCEs), glutathione S-transferases (GSTs) and UDP glucosyl-transferases (UGTs) [4,6,13,14]. However, due to the large number of mosquito genes encoding detoxification enzymes [15-17] pinpointing those responsible for resistance remains challenging [18]. Metabolic resistance has been mostly associated with an increased level of detoxification enzymes in resistant populations and multiple candidate genes have been identified by microarray screenings [6,18-21]. In contrast, polymorphism variations potentially affecting the functionality of detoxification enzymes have been hardly studied in mosquitoes despite evidences suggesting that this phenomenon may play a role in insecticide resistance [14,22]. Recently, polymorphism of a P450 gene has been associated with pyrethroid resistance in the mosquito *Culex pipiens* [23] and a reduction of sequence diversity in two P450 genes conferring resistance to pyrethroids has

been observed in *Anopheles funestus* [24]. This suggests that a deep analysis of the polymorphism associated with resistance can improve our understanding of mechanisms developed by mosquitoes to resist insecticides. Today, such knowledge gap can be overcome by high throughput sequencing approaches such as mRNA sequencing (RNA-seq), which can generate concomitantly gene expression and polymorphism data over the whole transcriptome from a single experiment [25-27].

In this context, the aim of the present study was to use RNA-seq for investigating transcription level and polymorphism variations associated with adaptation to three insecticides from distinct chemical families in the mosquito *Aedes aegypti*. A susceptible strain was selected with the pyrethroid permethrin, the neonicotinoid imidacloprid or the carbamate propoxur, to produce three resistant strains. After ten generations of selection, the constitutive resistance level of each resistant strain was measured and the transcriptome of each strain was deep sequenced. After mapping cDNA reads to the genome, gene expression and polymorphism variations linked to insecticide selection were identified and compared across strains. Results are discussed in regards of known and new putative adaptive mechanisms conferring insecticide resistance in mosquitoes.

Results

Insecticide resistance levels

After ten generations of larval selection with the insecticides permethrin (Perm-R strain), imidacloprid (Imida-R strain) or propoxur (Propo-R strain), bioassays revealed a constitutive increased resistance of each selected strain to its respective insecticide as compared to the parental susceptible strain (Table 1). Resistance levels of the Perm-R and Imida-R strains were moderate but significant (3.78 fold and 5.85 fold respectively). Although significant, the resistance level of the Propo-R strain to propoxur was considerably lower (1.84 fold).

Sequencing, read mapping and genome re-annotation

More than 269 million 75 bp cDNA reads were sequenced across all samples (Additional file 1: Table S1). Each

Table 1 Resistance levels after insecticide selection

Insecticide	Strain	LC ₅₀ (μg/L)	CI _{95%} (μg/L)	RR ₅₀	CI _{95%}
Permethrin	Susceptible	2.52	2.29 - 2.77	-	-
	Perm-R	9.47	6.21 - 14.43	3.78	2.24 - 6.30
Imidacloprid	Susceptible	240.30	208.74 - 276.67	-	-
	Imida-R	1406.40	1236.24 - 1599.87	5.85	4.47 - 7.66
Propoxur	Susceptible	441.20	392.16 - 496.34	-	-
	Propo-R	813.60	743.47 - 890.23	1.84	1.50 - 2.27

Resistance ratios were computed from LC₅₀ values as compared to the susceptible parental strain.

Resistance ratios with confidence intervals not overlapping the value of 1 are shown in bold.

mosquito strain was represented by two cDNA libraries with an average of 33.6 million reads per library. More than 80% of reads were successfully mapped on the *Ae. aegypti* genome. Filtering on sequence quality and mapping score retained more than 174 million reads (~ 65%). For each strain, RPKMs (Reads Per Kilobase of exon model per Million reads) obtained from the two cDNA library replicates were well correlated (Additional file 2: Figure S1), indicating moderate variations between technical replicates. In consequence, reads from technical replicates were pooled for further analyses.

A transcription signal was detected for 85% of known *Ae. aegypti* genes. Comparing transcript coverage between strains revealed similar distributions with RPKMs spanning more than 6 Logs and a median transcript coverage of 4.4 RPKM (~300 reads/Kb) (Additional file 3: Figure S2). Comparing genome annotation with the distribution and coverage of reads suggested incorrect gene boundary annotations for more than 3000 transcripts and identified more than 500 isolated novel transcription events (NTEs) based on their transcription signal, structure and high distance to known transcripts (Additional file 4: Table S2 and Additional file 5: Table S3). Distribution of mapped reads across the whole *Ae. aegypti* genome can be accessed at <http://vectorbase.org> using the 'configure this page' and 'RNAseq alignments' options of the genome browser (tracks 'Bora-Bora control', 'Perm-R', 'Imida-R' and 'Propo-R').

Differential transcription in insecticide-selected strains

Differential transcription analysis was performed on the 13105 transcripts showing a transcription signal higher than 0.5 RPKM in all strains. A total of 463 transcripts (~ 3.5%) including 413 known transcripts and 50 NTEs were considered differentially transcribed in any insecticide-selected strain as compared to the susceptible strain (> 3 fold in either direction and adjusted P value < 10⁻¹⁵; Table 2). Such threshold appeared biologically relevant as less than 2% of transcription ratios belonging to 140 housekeeping genes (all ribosomal proteins, actins and

tubulins) were found differentially transcribed as compared to the parental strain. Cross-comparison of transcription ratios (TRs) obtained from RNA-seq and DNA microarray was performed for the Imida-R strain from the same biological samples (Additional file 6: Figure S3). This comparison revealed a good correlation between the two techniques ($r^2 = 0.86$, slope ~ 1, most variations < 2 fold).

The balance between over- and under transcription was contrasted between each strain (Figure 1). The Imida-R strain showed the widest response to insecticide selection with 227 transcripts specifically over transcribed as compared to the susceptible strain. In contrast, fewer transcripts were affected in Perm-R and Propo-R strains with the majority of them being under transcribed. A total of 96 transcripts were found differentially expressed in multiple strains including 17 and 20 transcripts over- and under transcribed in all strains respectively.

A clustering analysis based on TRs as compared to the susceptible strain was performed on the 413 known transcripts differentially transcribed in any insecticide-selected strain (Figure 2 and Additional file 7: Table S4). This analysis confirmed the specific over transcription of several genes in the Imida-R strain and identified nine main transcript clusters based on their expression profile across strains. Assigning known transcripts to biological categories and comparing their frequency to all detected transcripts revealed protein families or biological functions enriched in the different clusters (Figure 2). When considering all clusters as a whole, a significant enrichment of transcripts related to immunity and cuticular proteins was observed. Cluster 1, representing transcripts strongly over transcribed in Perm-R strain included 5 hexamerins associated to cellular trafficking. These hexamerins showed very high TRs in the Perm-R strain (from 10 to 150 fold) but were also over transcribed in other insecticide-selected strains (up to 12 fold). Cluster 2, representing transcripts over transcribed in all insecticide-selected strains, showed a significant enrichment in detoxification enzymes. Cluster 3, representing transcripts strongly under transcribed in the Perm-R strain but not in others, was

Table 2 Differential transcription analysis overview

	Perm-R		Imida-R		Propo-R		Any strains	
	Transcripts	%	Transcripts	%	Transcripts	%	Transcripts	%
AC test P value	2858	21.8	2942	22.5	1881	14.4	4188	32.0
AC test P value and FC >3	181	1.4	339	2.6	131	1.0	463	3.5
Over transcribed	34	0.3	259	2.0	38	0.3	279	2.1
Known transcripts	34	0.3	235	1.8	37	0.3	255	1.9
New putative transcripts	0	0.0	24	0.2	1	0.0	24	0.2
Under transcribed	147	1.1	80	0.6	93	0.7	239	1.8
Known transcripts	131	1.0	70	0.5	76	0.6	210	1.6
New putative transcripts	16	0.1	10	0.1	17	0.1	29	0.2

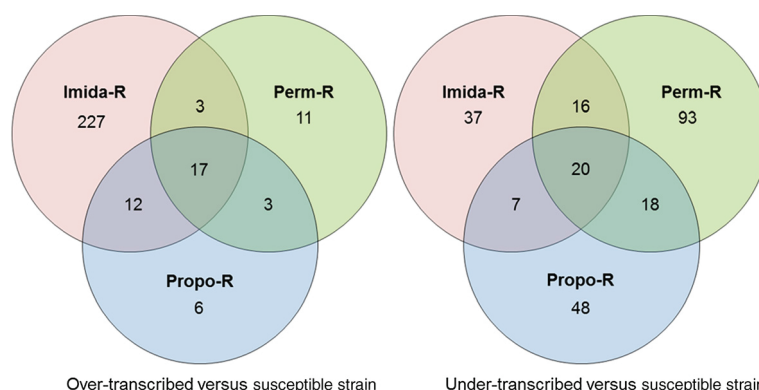


Figure 1 Transcripts differentially expressed after insecticide selection. For each Venn diagram section, the numbers of transcripts differentially expressed in any insecticide-selected strain as compared to the susceptible strain are indicated.

significantly enriched in cuticle proteins. Clusters 4 and 5 were characterized by transcripts showing a strong over transcription in the Imida-R strain and were significantly enriched in cuticular proteins. A significant enrichment in proteins potentially involved in immunity was also observed for cluster 4.

Polymorphism variations in insecticide-selected strains

A total of 220,499 SNP loci were identified between any strain and the *Ae. aegypti* reference genome. As expected in populations under selection and experiencing recurrent bottlenecks, a notable lower variability in insecticide-selected strains was observed as compared to the parental susceptible strain (Table 3). Comparative polymorphism analysis identified several alleles differentially represented between insecticide-selected strains and the parental susceptible strain (> 50% allele frequency difference, referred to as 'differential SNPs'). The Perm-R strain showed more differential SNPs (1315) as compared to other insecticide-selected strains (811 and 812 for the Imida-R and Propo-R strains, respectively). Predicted genic effects of these variations were equally distributed among insecticide-selected strains with ~ 2.5% of them located in 5'UTRs, ~ 9% in 3'UTRs, ~ 60% within transcript coding sequences, ~ 5% in introns and ~ 20% within 1 kb of gene boundaries (referred to as 'intergenic'). No significant correlation was observed between transcripts differentially transcribed and the presence of differential SNPs in their 5' or 3'UTRs (not shown). More than 1080 transcripts were affected by differential SNPs in at least one insecticide-selected strain (Figure 3). Up to 22 differential SNPs per transcript were observed, with 21 transcripts affected by > 10 differential SNPs. The Perm-R strain showed a higher number of transcripts affected by differential SNPs as compared to other strains (582 versus 415 and 420). Only 25 transcripts were affected by differential SNPs in all insecticide-selected strains. No differential SNP was found in transcripts encoding known insecticide

target proteins such as the para-type voltage-gated sodium channel (permethrin), the acetylcholinesterase (propoxur) or the nicotinic acetylcholine receptor (imidacloprid).

More than 1650 differential SNPs were detected within coding regions (Figure 4 and Additional file 8: Table S5). Clustering analysis based on allele frequency variations between each insecticide-selected strain and the parental strain evidenced the differential response of each strain to insecticide selection. The Perm-R strain showed larger allele frequency variations as compared to other strains (median frequency variations of 50.2%; 29.8%; 27.9% for Perm-R, Imida-R and Propo-R respectively). When comparing all detected transcripts with those affected by differential SNPs (Figure 4, all clusters), a significant enrichment of transcripts encoding detoxification enzymes was detected. Such enrichment was also observed when considering variations predicted as non-synonymous only. When considering each cluster independently, clusters 1 and 9, representing differential SNPs specific to the Imida-R strain, did not show any significant enrichment in any biological category. Clusters 2, 4 and 6 were composed of differential SNPs specific to the Perm-R strain and revealed a significant enrichment in transcripts encoding detoxification enzymes, with multiple cytochrome P450s affected. As observed for transcription level variations, several transcripts encoding hexamerins were affected by large polymorphism variations in the Perm-R strain (Additional file 8: Table S5). Clusters 3 and 8, representing differential SNPs found in the Imida-R and Propo-R strains, also showed an enrichment in detoxification enzymes, as well as an enrichment in transcripts involved in immune response.

Gene ontology terms enrichment analyses

Gene Ontology (GO) term enrichment analyses were performed independently on transcripts significantly over- or under transcribed or affected by differential SNPs in their coding region (Additional file 9: Figure S4). These analyses

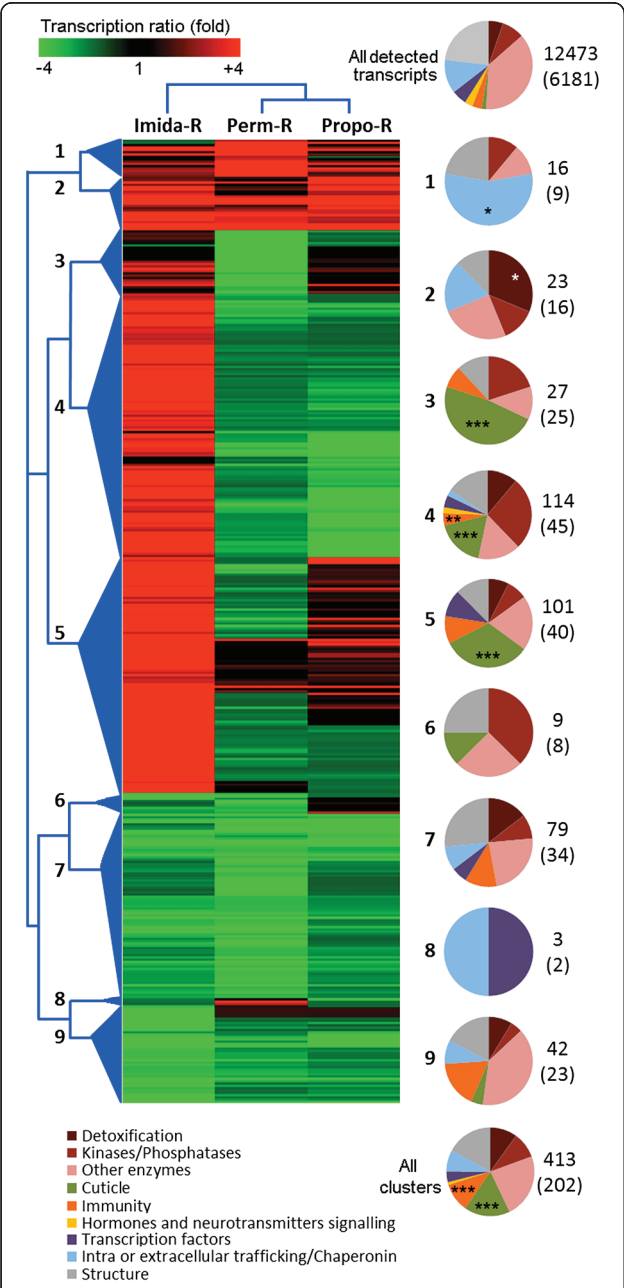


Figure 2 Clustering of transcripts differentially expressed across strains. The analysis was performed on the 413 known transcripts significantly differentially expressed in any insecticide-selected strain compared to the susceptible strain. Clustering was based on Euclidean distance of fold changes as compared to the susceptible strain and complete linkage algorithm. Pie charts describe biological functions affected within main clusters based on the number of transcripts assigned to each function. Stars indicate biological functions significantly enriched compared to their representation among all detected transcripts (Fisher's test adjusted P value: * ≤ 0.05 , ** ≤ 0.01 , *** ≤ 0.001). The total number of transcripts constituting each cluster is indicated. The number of transcripts with predicted functions used for building each pie chart is shown within brackets.

Table 3 Differential polymorphism analysis overview

	Perm-R		Imida-R		Propo-R	
	SNPs	%	SNPs	%	SNPs	%
Detected SNPs	143737	100	143645	100	133892	100
Differential SNPs	1315	0.9	811	0.6	812	0.6
Genic consequences*	1403	100	881	100	908	100
5' UTR	32	2.3	28	3.2	25	2.8
Synonymous coding	715	51.0	442	50.2	453	49.9
Non-synonymous Coding	137	9.8	95	10.8	108	11.9
Intronic	66	4.7	45	5.1	54	5.9
3' UTR	121	8.6	88	10.0	87	9.6
Intergenic	325	23.2	184	20.9	181	19.9

*Consequences of allelic changes are only indicated for differential SNPs (i.e. alleles showing > 50% allelic frequency difference in any selected strain as compared to the susceptible strain). These consequences were computed based on genome annotation.

confirmed the distinct response of each strain to insecticide selection. Among GO terms representing genes over transcribed in insecticide-selected strains, terms related to cuticle proteins were strongly enriched in the Imida-R strain. Terms related to oxygen transport or to hexamerins were enriched in both the Perm-R and Imida-R strains, together with those related to iron homeostasis and iron binding. Among GO terms represented by under transcribed genes, multiple terms related to immune response were enriched in insecticide-selected strains. When considering transcripts affected by differential SNPs, no GO term was enriched in the Imida-R strain while only

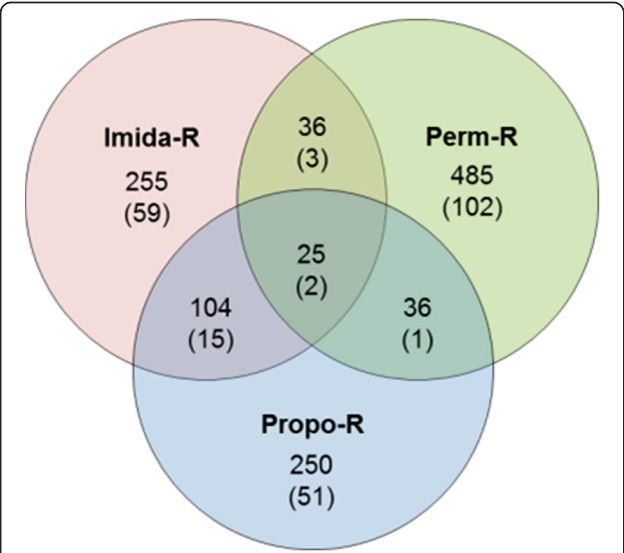
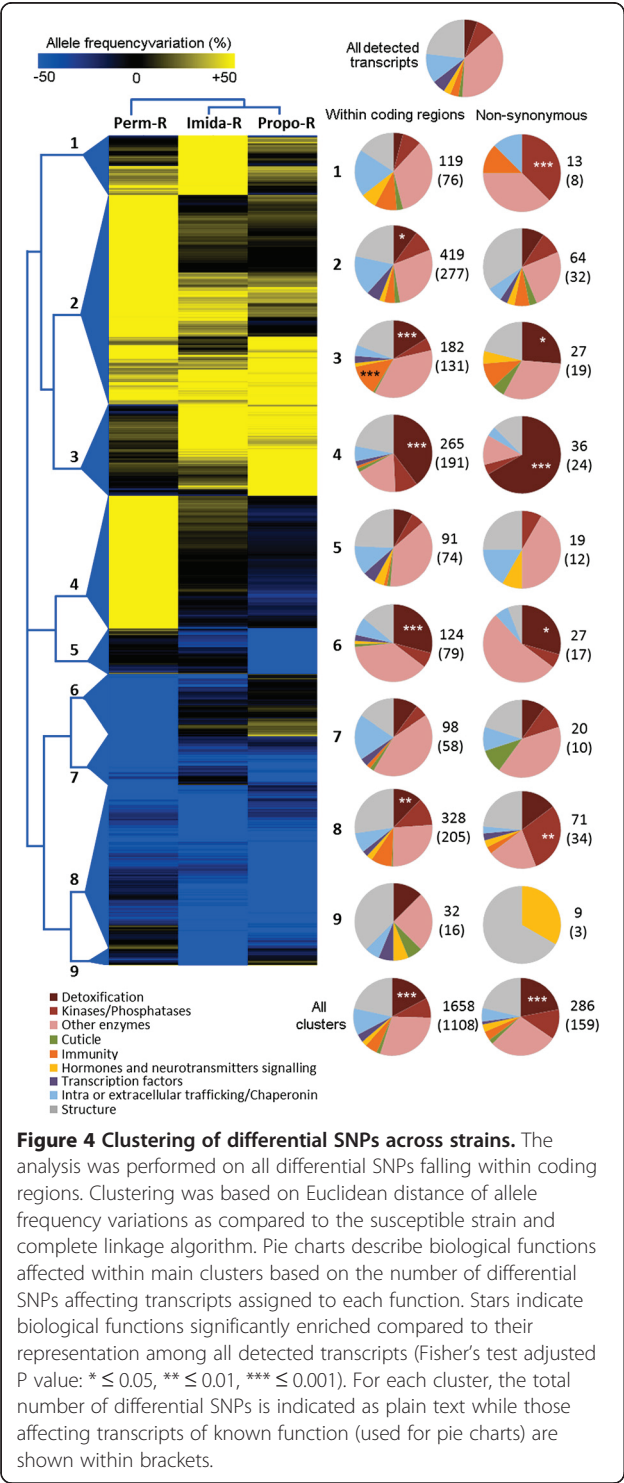


Figure 3 Transcripts affected by differential SNPs. For each Venn diagram section, the number of transcripts affected by differential SNPs is shown. The number of transcripts affected by differential SNPs predicted as non-synonymous according to genome annotation are shown within brackets.



'dehydrogenase activity' was enriched in the Propo-R strain. In contrast, the Perm-R strain revealed an enrichment of all terms related to cytochrome P450s such as 'monooxygenases activity', 'electron carrier activity', 'tetrapyrrole binding', 'heme binding' and 'iron ion binding'.

Terms related to hexamerins were also enriched in Perm-R together with terms related to various enzyme families.

Focus on transcripts potentially involved in insecticide detoxification

Focusing on cytochrome P450 monooxygenases (CYP genes, Figure 5) revealed that few CYPs showed significant transcription level variations, with none being over transcribed in the Perm-R strain and only four CYPs (*CYP6BB2*, *CYP9M9*, *CYP6N9* and *CYP6Z8*) being over transcribed in the Imida-R and Propo-R strains. Four CYPs were under transcribed in the Perm-R strain (*CYP6M5*, *CYP6M10*, *CYP6M9* and a *CYP12F*). This *CYP12F* was also under transcribed in the two other strains. When considering differential SNPs, the Perm-R strain carried a much higher number of differential SNPs affecting P450s as compared to other strains. The 19 CYP genes specifically affected by permethrin selection included 13 CYP6s belonging to a dense P450 cluster located on supercontig 1.371 composed of six CYP6Ns, five CYP6Ms, four CYP6Zs, *CYP6S3* and *CYP6Y3* (Additional file 10: Figure S5). In contrast, only 5 and 4 CYPs were affected by differential SNPs in the Imida-R and Propo-R strains respectively. Several CYPs were affected by variations predicted as non-synonymous (26 variations affecting 16 genes) while 17 variations affecting 14 genes were located within substrate recognition site regions (SRS), potentially affecting the active site of these P450s.

When considering other transcripts potentially involved in resistance (Figure 6), the strong response of the Imida-R strain to insecticide selection through transcription level modifications was confirmed, with several detoxification enzymes being over expressed including the glutathione S-transferase *GSTD4*, one glycosyltransferase together with multiple oxidases, peroxidases and dehydrogenases. Several kinases were also specifically over-transcribed in the Imida-R strain. Fewer transcripts were affected in the Perm-R and Propo-R strains, including one aldo-keto reductase, one glycosyltransferase, one aldehyde oxidase and one alcohol dehydrogenase. As opposed to CYP genes, differential SNPs affecting other detoxification genes were well-balanced between strains with 66 variations affecting 26 distinct genes. Among them, ten variations were predicted as non-synonymous. In the Perm-R strain, ten genes were specifically affected, including two short-chain dehydrogenases, two heme peroxidases, two prophenoloxdases, one alcohol dehydrogenase, the glutathione S-transferase *GSTE4* and one ABC transporter. Ten variations affecting seven genes including the *GSTD1*, three glycosyltransferases, one aldehyde oxidase, one ABC transporter and one oxidase/peroxidase were specific to the Imida-R strain. Finally, 24 variations affecting seven genes including the *GSTD1*, one

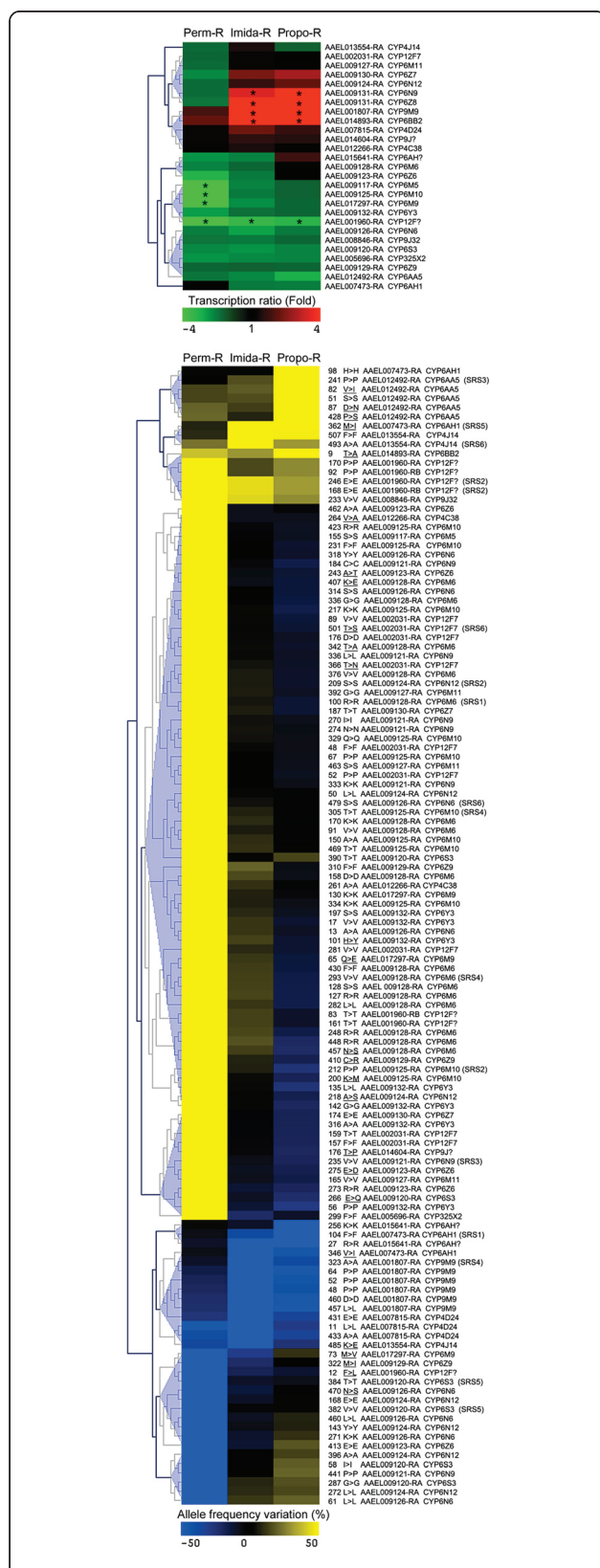


Figure 5 Focus on detoxification: cytochrome P450s. Clustering analyses of transcription level variations (upper panel) and differential SNPs (lower panel) affecting cytochrome P450 monooxygenases (CYP genes). Clustering was performed on all transcripts showing significant transcription level variations or differential SNPs within their coding region in any strain. The green-red color scale indicates transcription level variations as compared to the susceptible strain. Stars indicate a significant differential transcription. Blue-yellow color scale indicates allele frequency variations as compared to the susceptible strain. Amino acid position, amino-acid change, transcript number and gene names are indicated. Non-synonymous variations according to genome annotation are underlined. SNPs falling within P450 Substrate Recognition Sites (SRS) are indicated. Names ending with a question mark indicate genes with ambiguous gene name (subfamily indicated)

glycosyltransferase, one heme peroxidase, one carboxylesterase, two ABC transporters and one oxidase/peroxidase were specific to the Propo-R strain.

Discussion

Characterizing resistance mechanisms is essential for improving resistance management. Although target site modifications play a major role in resistance [4,5,28,29], other mechanisms such as insecticide biodegradation, altered transport, sequestration and modification of the insect cuticle also account for a significant part of resistance [6,18,30,31]. However, the intricacy of these mechanisms makes challenging the identification of candidate genes for functional validation [21]. Gene expression microarrays are mostly used for identifying genes differentially transcribed in resistant populations but suffer from technical biases [21,32,33]. In contrast RNA-seq generates transcription data with a higher resolution, better dynamic range and lower technical variation [27]. In addition, RNA-seq produces polymorphism data and useful information to re-annotate gene models [25,26]. Despite recent studies pointing out the role of polymorphism variations in insecticide resistance [22-24], such aspect has never been investigated at the transcriptome level in mosquitoes. Indeed, the only study using RNA-seq to investigate insecticide resistance in mosquitoes did not consider polymorphism variations [34]. In this regard, the present study represents the first attempt to use RNA-seq for examining concomitantly quantitative and qualitative transcriptome changes associated with resistance to different insecticides in mosquitoes.

Insecticide selection and resistance levels

After 10 generations of selection, bioassays revealed a constitutive increased resistance of each selected strain to its respective insecticide compared to the susceptible parental strain. Although resistance levels were low as compared to what can be observed *in natura*, they were significant regarding the few generations of selection,

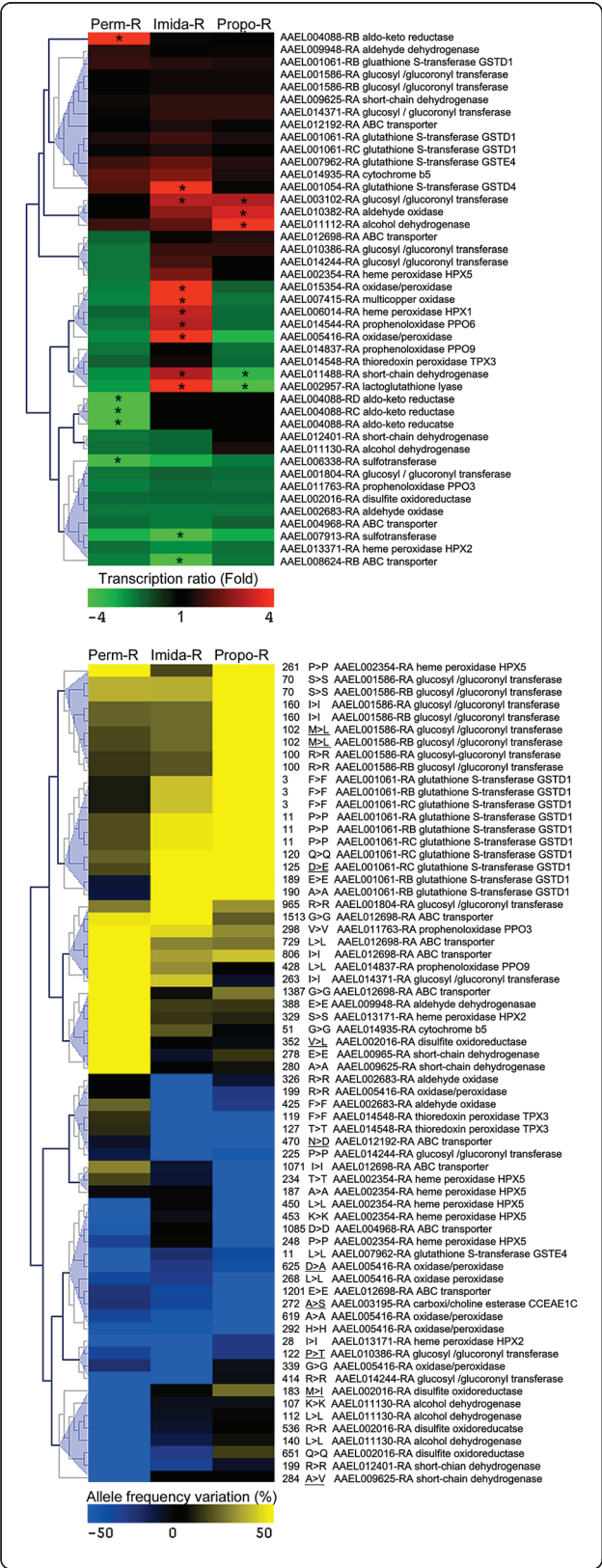


Figure 6 Focus on detoxification: Other enzymes and transporters. Clustering analyses of transcription level variations (upper panel) and SNPs (lower panel) affecting enzymes and transporters potentially involved in insecticide detoxification. Only transcripts or differential SNPs falling within coding regions are shown. Green-red color scale indicates transcription level variations as compared to the susceptible strain. Stars indicate a significant differential transcription. Blue-yellow color scale indicates allele frequency difference as compared to the susceptible strain. Amino acid position, amino-acid change, transcript number and gene names are indicated. Non-synonymous variations according to genome annotation are underlined.

the full susceptibility of the parental strain and the absence of target-site resistance alleles. The rapid rise of resistance suggests that alleles conferring a better fitness in presence of insecticides are already present in susceptible populations and can be promptly selected under a constant selection pressure. Although laboratory selection does not fully mimic adaptive processes occurring *in natura* (e.g. lower population sizes, different environment, no introduction of resistant alleles by migration ...), selecting all resistant strains from a single susceptible strain allowed minimizing variations related to different genetic backgrounds. Using a fully susceptible parental strain also allowed focusing on non-target site resistance mechanisms (no target-site mutations detected in parental or selected strains).

RNA-seq as a tool for studying insecticide resistance in mosquitoes

A total of 270 million cDNA reads were sequenced across all samples and 80% of them were successfully mapped to *Ae. aegypti* reference genome. Such mapping efficiency appeared acceptable considering polymorphism variations occurring between the reference genome (Liverpool strain) and the parental strain used in our study (Bora-Bora strain). The high correlation of expression data obtained from cDNA library replicates confirmed the robustness of cDNA library construction and sequencing procedures. By applying high-stringency sequence quality and transcript coverage filtering, high fidelity transcription data were recovered for more than 13000 transcripts. Such detection level was comparable to those obtained with DNA microarrays at the same life stage [35,36]. More than 2500 differential SNPs linked to insecticide selection were identified. Although our experimental design did not control for stochastic effects (genetic drift) and the presence of false positives is likely, transcripts affected by these differential SNPs represent strong candidates for further functional validation studies. Little overlap was found between transcripts differentially transcribed in selected strains and those affected by differential SNPs. This was expected as RNA-seq data are restricted to transcripts and did not cover regulatory regions often located outside transcript boundaries.

Challenging reads distribution with genome annotation identified > 3000 transcripts incorrectly annotated with most of them showing wrong UTR boundaries or modification of exon/intron structure. In addition, more than 500 lonely genomic regions showing high transcription signals and realistic exon/intron structures were identified. Further analyses are now required for assigning them to new exons of known transcripts, novel transcripts, pseudogenes or non-coding RNAs.

Transcriptome changes associated with insecticide selection

Overall, our study revealed diverse response patterns depending on the insecticide used for selection. The Imida-R strain selected with the neonicotinoid imidacloprid showed the highest resistance level together with the strongest differential transcription response with numerous genes being over transcribed. In contrast, the Perm-R strain selected with the pyrethroid permethrin revealed a moderate differential transcription response but a lot of polymorphism variations following insecticide selection. The Propo-R strain selected with the carbamate propoxur showed an intermediate pattern. These dissimilar quantitative and qualitative transcriptome changes may reflect different adaptive strategies driven by costs and benefits associated with resistance mechanisms to each insecticide.

Insecticide resistance and immunity

Multiple transcripts related to immune response were affected by insecticide selection with several of them under transcribed in all resistant strains (cecropins, defensins, lectins, ...) and others affected by differential SNPs (defensins, clip-domain proteases, spatzle proteins...). Mosquito humoral response is involved in their capacity to host and transmit viruses [37] or parasites [38]. As mentioned in Alout et al. [39], our results support an association between insecticide resistance and the capacity of mosquitoes to host and transmit pathogens, which may affect the control of mosquito-borne diseases [40].

Altered insecticide transport and sequestration

Multiple transcripts encoding cuticular proteins were over transcribed in the Imida-R strain while most of them were under transcribed in the Perm-R strain and not affected in the Propo-R strain. Such strong effect in the Imida-R strain was not associated to changes in the polymorphism of these transcripts, suggesting that insecticide selection is affecting their regulation rather than their conformation. Cuticle plays a crucial role in protecting insects from their environment. The vast majority of chemical insecticides are active by contact and changes in cuticle thickness or conformation have been suggested to contribute to resistance in mosquitoes [31,41,42]. Our data support previous studies suggesting a significant role

of cuticle in the adaptation to neonicotinoid insecticides [36,43,44]. The role of cuticle in response to imidacloprid selection was supported by the specific over transcription of the multi-copper oxidase AAEL007415 in the Imida-R strain as its *An. gambiae* orthologue is involved in cuticle and egg shell tanning [45,46]. Numerous protein families are involved in cuticle biosynthesis and homeostasis including enzymes, transporters and transcription factors and further studies are now required for pinpointing those controlling cuticular resistance in mosquitoes.

Several kinases were specifically over-transcribed in the Imida-R strain. Kinases are involved in multiple regulatory mechanisms and their involvement in the response of insects to insecticides is likely. Indeed, recent studies showed that the phosphorylation state of acetylcholine nicotinic receptors can modulate the efficacy of neonicotinoid insecticides [47-49].

Five transcripts encoding hexamerins were strongly over transcribed in the Perm-R strain and in a lesser extend in other resistant strains. These transcripts, located on different supercontigs, were also affected by differential SNPs suggesting a selection imprint on these proteins. Insect hexamerins may be involved in hormone transport, energy and amino acid storage, cuticle biosynthesis and immune defense [50,51]. Hexamerins of the lepidopteran *Heliothis zea* have been shown to bind insecticides, suggesting a direct role in resistance by sequestration or altered transport [52]. Deciphering if hexamerins are impacted by insecticide selection because of their ability to bind insecticides, their interaction with cuticle homeostasis or their role in resources re-allocation associated to fitness costs remains unclear.

Finally, ATP-binding cassette transporters (ABC transporters) can play a role in adaptation to xenobiotics [53] and have been associated to insecticide resistance in mosquitoes [30,54]. In our study, the response of ABC transporters to insecticide selection was marginal. Indeed, only one ABC transporter (AAEL008624) was found differentially transcribed in response to insecticide selection and this gene was down regulated in all resistant strains. Four others were affected by differential SNPs but their allele frequency variations in resistance strains were low.

Insecticide biodegradation

Detoxification enzymes play a major role in insecticide resistance [4,6,13,14,18,55]. As expected, these enzymes were well represented in our data set but showed distinct patterns depending on the nature of the insecticide used for selection.

Response to selection with the neonicotinoid imidacloprid (Imida-R strain) was characterized by the over transcription of multiple P450s, oxidases, transferases and one alcohol dehydrogenase, supporting the involvement of multiple enzymes in imidacloprid biodegradation pathways.

Among them, the P450 CYP6BB2 was recently pointed out as a solid candidate for imidacloprid metabolism based on gene expression data and substrate binding predictions [36]. The aldehyde oxidase AAEL002683 was over transcribed and affected by polymorphism variations in the Imida-R strain. A recent study confirmed that aldehyde oxidases can contribute to neonicotinoid metabolism through nitro-reduction [56].

Several P450s over transcribed in the Imida-R strain were also found over transcribed in response to propoxur selection. Cross resistance between these two insecticides was identified [36] and the potency of particular P450s to confer resistance to multiple insecticides has been shown. For example, *An. gambiae* CYP6Z1 metabolizes the organochlorine DDT and the carbamate carbaryl [22] while CYP6M2 metabolizes both DDT and pyrethroids [57,58].

Metabolic resistance of mosquitoes to pyrethroids has been mainly associated with an over expression of P450s able to metabolize them. Among the multiple candidates identified by microarray screenings, *An. gambiae* CYP6M2 and CYP6P3, *An. funestus* CYP6P9, *Ae. aegypti* CYP9J32, CYP9J24, CYP9J28, and *Cx quinquefasciatus* CYP6M10 and CYP4H24 have been validated as pyrethroid metabolizers [review in 18]. CYP6Zs and CYP6Ms have also been associated with pyrethroid resistance by QTL in *An. funestus* where resistance mainly relies on metabolic mechanisms [59]. Recently, the central role of mosquito CYP6Zs in pyrethroid degradation pathway was revealed [55]. In the present study few P450s were found over transcribed in the Perm-R strain. Among them, CYP6BB2 was also found strongly over transcribed in pyrethroid resistant populations from Cuba and Cayman islands [30]. Unexpectedly, known *Ae. aegypti* pyrethroid metabolizers or paralogs of those validated from other mosquito species were not found over transcribed in the Perm-R strain. However, a strong selection imprint was detected in the Perm-R strain in a P450 cluster in supercontig 1.371 containing strong candidates CYP6Ms, CYP6Ns and CYP6Zs, suggesting that the selection of particular P450 variants can contribute to pyrethroid resistance. In mammals, it is well known that P450 variants can display different substrate specificity [60-64]. To date, such variations have been neglected in mosquitoes with only few studies pointing out P450 alleles associated with insecticide resistance [22,23]. Finally, the strong selection imprint observed in these P450s might explain their unexpected under transcription in the Perm-R strain. Indeed, the apparent under expression of transcripts affected by differential SNPs might be the consequence of a mapping bias due to a higher divergence from the reference genome or an enrichment in low-expressed alleles [65,66]. Although further analyses are required for investigating the role of allele-specific expression in resistance, our data supports the

selection of particular detoxification enzyme variants by insecticides.

Conclusions

The present study primarily aimed at assessing the usefulness of RNA-seq to investigate insecticide resistance mechanisms in mosquitoes. Results confirmed that this technique produces high-quality gene expression data together with solid polymorphism data. Distinct responses to selection with insecticides from different chemical families were observed with a balance between gene expression and polymorphism variations. Polymorphism variations of P450 enzymes were strongly linked to pyrethroid selection. Although additional analyses are required to validate variants linked to resistance, such finding highlights the necessity to consider both gene expression and polymorphism variations for identifying candidate genes potentially involved in insecticide resistance. As sequencing costs are decreasing and new sequencing strategies and bioinformatics pipelines are developed, obtaining gene expression and polymorphism data from the same samples using high-throughput sequencing should now be considered as a valuable alternative to microarrays.

Methods

Mosquito selection with insecticides and bioassays

The mosquito *Ae. aegypti*, was used in the present study. Mosquitoes were reared in standard insectary conditions (26°C, 14 h/10 h light/dark, 80% relative humidity) in tap water (larvae) and net cages (adults). Larvae and adults were fed with hay pellets and papers impregnated with honey respectively. Blood feeding of adult females was performed on mice. Mice were maintained in an animal house agreed by French Ministry of animal welfare (n° B 38 421 10 001) and used in accordance to EU laws and the relevant ethic committee recommendations (ComEth Grenoble - C2EA - 12). The laboratory strain Bora-Bora, originating from French Polynesia and fully susceptible to insecticides, was used as a parental strain to select three independent strains with the pyrethroid insecticide permethrin (Perm-R strain), the neonicotinoid insecticide imidacloprid (Imida-R strain) and the carbamate insecticide propoxur (Propo-R strain). Both pyrethroid and carbamate insecticides are heavily used against mosquitoes and resistance to these insecticides has been reported worldwide. Neonicotinoids are marginally used against mosquitoes but represent one possible alternative when resistance to other insecticide threatens the efficacy of mosquito control [36]. Selection was performed by exposing early 4th-stage larvae for 24 h to a lethal dose of each insecticide. For each strain, the dose of insecticide was adjusted at each generation (4 to 6 µg/L permethrin, 500 to 1000 µg/L imidacloprid and 500 to 800 µg/L propoxur) in order to reach 60-80% larval

mortality after 24 h exposure. Surviving larvae were transferred in clean tap water, fed with standard larval food and allowed to emerge. Adults were allowed to reproduce for 4 days and blood-fed to obtain eggs for the next generation. In order to limit bottleneck effects, each generation was seeded with more than 6000 individuals. Selection process was carried out in parallel for all strains during ten generations. During this process, the susceptible parental strain was maintained in similar condition without insecticide selection. Bioassays and molecular work were performed on early 4th-stage larvae of the 11th generation (G_{11} larvae) bred in standard conditions and not exposed to insecticides.

To assess the constitutive resistance level of each selected strain, larval bioassays were conducted with permethrin, imidacloprid and propoxur comparatively to the susceptible parental strain. Five doses of each insecticide and four replicates of 25 larvae per dose were used. Doses of permethrin (1.5 to 6.5 $\mu\text{g/L}$), imidacloprid (150 to 2200 $\mu\text{g/L}$) and propoxur (100 to 2000 $\mu\text{g/L}$) were chosen in order to cover the whole mortality range after 24 h exposure. Lethal concentrations corresponding to 50% mortality (LC_{50}) and their 95% confident intervals ($CI_{95\%}$) were then calculated with a probit approach for each strain using XL-Stat (Addinsoft, Paris, France). Resistance ratios (RR_{50} based on LC_{50} values) were calculated by comparison to the susceptible parental strain.

RNA extraction and cDNA libraries preparation

For each strain, total RNA was extracted from G_{11} larvae obtained from three independent egg batches (three biological replicates per strain). Each biological replicate consisted of 180 larvae reared in 200 mL tap water in standardized insectary conditions. For each biological replicate, total RNA was extracted from 60 4th-stage larvae using the RNAqueous-4PCR kit (Applied Biosystems/Ambion, Austin, TX, USA), according to the manufacturer's instructions. Total RNA quality and quantity were assessed with a Nanodrop ND1000 (Thermo Scientific, USA) and a 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA). After extraction, total RNAs from each biological replicate were pooled in equal quantity to obtain a total RNA mixture representative of 180 individuals. Total RNA pools from each strain were then used for preparing cDNA libraries using the mRNA-Seq Sample Prep Kit (Part 1004898 Rev D, Illumina, USA). Two replicates of cDNA libraries were prepared for each strain as follows. Briefly, mRNAs were purified using poly-T beads and chemically fragmented. These fragmented mRNAs were reverse-transcribed using Superscript II (Invitrogen) at 42°C for 50 min. Double-stranded cDNAs were then synthesized and mRNAs removed using DNA polymerase I and RNase H at 16°C for 2.5 hours. Double-stranded cDNAs were purified using QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) and

processed for end-repair and 3' adenylation using Klenow polymerase. Sequencing adaptors were then ligated using DNA ligase. Adapter-ligated cDNA libraries were then purified on 2% agarose gel based on a size range of 200 ± 25 bp. Adapter-ligated cDNA libraries were then enriched by 15 PCR cycles with adaptor-specific primers using Phusion DNA polymerase (Finnzymes Oy). Enriched cDNA libraries were then purified using QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) before quality control analysis on an Agilent 2100 Bioanalyzer.

Sequencing, read mapping and genome re-annotation

Each double-stranded cDNA library was sequenced as single reads of 75 bp in a distinct flow cell lane with a Genome Analyzer II (Illumina) at the National Sequencing Center (Genoscope, Evry, France). Reads were then mapped to the *Ae.aegypti* genome sequence (Aaeg L1.2 gene set, <http://vectorbase.org>) using the Tophat algorithm with default parameters (<http://tophat.cbcb.umd.edu>, release 1.0.14) [67], leading to an average mapping rate of 80%. Bam files were then loaded into Genespring NGS version 12.5 (Agilent Technologies) for further analysis. Reads were then filtered based on the sequence quality (mean read quality ≥ 30 and with < 10 Ns) and mapping quality (alignment score ≥ 98), and non-primary multiply mapped reads were removed. The remaining reads were used for all subsequent analyses. Read coverage was computed and genome annotation was challenged based on read distribution and coverage. Default feature detection parameters were used (min exon length percentile 10; min intro length percentile 10; max intron length percentile 90; min exon RPKM percentile 50; min gene RPKM percentile 50; min gene length percentile 10; min exon RPKM with respect to host gene percentage 75; min number of reads in exon 10). Modified exon-intron structures and new putative transcripts were proposed based on read coverage, read splicing events and distance with respect to existing genes and transcripts. Reads per Kilobase exon Model per Million sequenced reads (RPKM) were calculated for all known and putative new transcripts. Transcript RPKM values were used for assessing the variability between library replicates for each strain.

Differential transcription analysis

In order to avoid estimating transcription ratios from low coverage transcripts, only the 13105 transcripts showing at least 0.5 RPKM per condition (~ 30 reads/kb) were considered for differential transcription analysis. Differential transcription of each transcript was then tested between insecticide-selected strains and the susceptible parental strain using an Audic-Claverie test (AC test) based on read counts [68] with a Benjamini and Hochberg's multiple testing correction [69]. Transcripts showing an adjusted P value $< 10^{-15}$ and a fold change > 3 in either direction

were considered as differentially transcribed between insecticide-selected strains and the parental susceptible strain. RNA-seq transcription data from the Imida-R strain were compared with transcription data obtained from the same biological samples with the *Aedes aegypti* 15 K DNA microarray as previously described [36]. Only the 326 transcripts showing significant adjusted P values in both techniques were considered.

Polymorphism detection and differential analysis

Detection of polymorphisms was performed based on the 174 million reads passing quality filters with the following parameters: confidence score threshold = 100, coverage > 20 reads, base quality cut off = 5, ignore locations within or next to homopolymer stretches > 10 nucleotides. Among all detected polymorphism variations, only SNP substitutions were considered for differential polymorphism analyses. SNP allele frequencies were then computed between each insecticide-selected strain and the susceptible strain. Allele frequencies were considered as differential between an insecticide-selected strain and the susceptible strain (hereafter named as differential SNPs) if the following conditions were fulfilled: *i*) Total read coverage at SNP position between both strains ≥ 50 , *ii*) Strand bias at SNP position ≤ 50 for both strains and *iii*) Allele frequency difference between both strains > 50% in either direction. Potential genic effects of SNPs were computed by comparing SNP with reference genome annotation. Genic effects were defined as 5'UTR, Synonymous, Non-synonymous, Intronic, 3'UTR and Inter-genic (*i.e.* close but not within gene boundaries).

GO term enrichment analyses

Go term enrichment analyses were conducted on *i*) transcripts significantly over transcribed in insecticide-selected strains compared to the susceptible strain, *ii*) transcripts significantly under transcribed in insecticide-selected strains compared to the susceptible strain and *iii*) transcripts affected by differential SNPs in their coding sequence as compared to the susceptible strain. GO term enrichment analyses were performed separately on each transcript list versus all detected transcripts. Enrichment statistics were computed based on hypergeometric distribution and adjusted with Benjamini-Yekutieli's multiple testing correction [70] which takes into account the dependency among GO terms. GO terms showing an adjusted P value ≤ 0.05 were considered as significantly enriched in insecticide-selected strains compared to the susceptible strain.

Clustering analyses

All clustering analyses were performed with TM4 MEV version 4.3.02 [71] using Euclidean distance and complete linkage algorithm with optimization of gene and condition

trees. Transcripts significantly differentially transcribed (see above for thresholds) in any insecticide-selected strain compared to the parental susceptible strain were clustered based on their TR (\log_2 ratios). Annotated transcripts represented in the main clusters were then assigned to nine biological categories based on their annotation (including GO terms). Categories were defined as follow: 'Detoxification', 'Kinases/Phosphatases', 'Other enzymes', 'Cuticle', 'Immunity', 'Hormones and neurotransmitters signaling', 'Transcription factors', 'Intra or extracellular trafficking/chaperonins' and 'Structure'. Enrichment of these categories compared to all detected transcripts was then computed using a one-side Fisher's exact test followed by Benjamini and Hochberg multiple testing correction [69]. Categories showing a corrected P value < 0.05 were considered significantly enriched. A similar clustering analysis was performed with differential SNPs (see above for detailed criteria) falling in coding regions. Clustering was performed as described above using allele frequency variations (-100% to +100%) in each strain as compared to the susceptible strain. Differential SNPs were assigned to nine different biological categories (see above) in regard of the nature of the transcript affected. For each cluster, biological category enrichment was computed versus all detected transcripts as described above.

Clustering analyses were then focused on transcripts encoding genes potentially involved in insecticide detoxification pathways (detoxification *sensus lato*). Clustering of both transcription level variations and differential SNPs were performed as described above. Separate analyses were conducted for cytochrome P450 monooxygenases (CYPs) and other detoxification transcripts.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Sequencing and mapping statistics.

Additional file 2: Figure S1. RPKM correlation between cDNA library replicates. Each dot represents one transcript. Only transcripts showing more than 0.5 RPKM are shown.

Additional file 3: Figure S2. Comparison of read coverage across strains. Read coverage are indicated for each strain as RPKM (log scale). Coverage distributions are compared for unmodified transcripts (top), re-annotated transcripts (bottom left), and new putative transcripts (bottom right).

Additional file 4: Table S2. Overview of transcriptome re-annotation.

Additional file 5: Table S3. Genomic location of all novel transcribed features.

Additional file 6: Figure S3. Cross-validation of transcription levels between RNA-seq and microarrays. Comparison is based on transcription data obtained from the Imida-R strain versus susceptible strain. RNA-seq and microarray data were obtained from the same generation. Correlation was performed on the 326 transcripts showing a significant differential transcription level in both studies. Solid grey line represents an equal transcription ratio between both techniques. Grey dashed lines represent a two-fold variation.

Additional file 7: Table S4. Transcripts differentially expressed after insecticide selection. For each transcript, transcription level (fold)

compared to the susceptible strain, adjusted P value and RPKM are indicated. Clusters and biological functions as described in Figure 2 are indicated.

Additional file 8: Table S5. Differential SNPs linked to insecticide selection. For each SNP, allele frequency variations in each strain compared to the susceptible strain are indicated together with the affected transcript, the cDNA position, the amino-acid position and the amino acid change as compared to the reference genome. Clusters and biological functions as described in Figure 4 are indicated.

Additional file 9: Figure S4. GO terms enrichment analysis. Analysis was performed on all transcripts significantly differentially expressed or affected by differential SNPs in insecticide-selected strains as compared to the susceptible strain. GO terms associated to each transcript were extracted from Vectorbase. GO terms showing adjusted P values < 0.05 were considered significantly enriched.

Additional file 10: Figure S5. Differential SNPs linked to permethrin selection in superconting 1.371. Transcripts location and read coverage are indicated. Transcripts showing differential SNPs in the Perm-R strain as compared to the susceptible strain are shown in red. For each transcript, the number of differential SNPs and their predicted genic effects are indicated.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

JPD conceived and coordinated the study, prepared the samples, analyzed data and wrote the manuscript. FF performed statistical analyses and help to draft the manuscript. ACP contributed to data analysis and helped to draft the manuscript. RP, MAR and AB contributed to biological and molecular samples preparation. VN performed mapping of RNA-seq data. SR contributed to study design, participated in biological sample preparation, data analysis and manuscript preparation. All authors read and approved the final manuscript.

Data access

RNA-seq sequence data have been deposited at EBI/SRA/ArrayExpress under the accession number E-MTAB-1635. Final gene expression data (RPKM, Fold changes and adjusted P values) are available at <http://vectorbase.org>. Distribution of mapped reads across mosquito genome can be visualized using the 'configure this page' and 'RNAseq alignments' options of the vectorbase *Ae. aegypti* genome browser (tracks 'Bora-Bora control', 'Perm-R', 'Imida-R' and 'Propo-R').

Acknowledgements

This work was funded by a research grant from the French Agence Nationale de la Recherche (ANR Mosquito-Env 07SEST014 project). We also acknowledge funding from the federative structure Environnemental and Systems Biology (BEeSy) of Grenoble – Alpes University. We thank Dr. F. Boyer, and Dr. L. Zinger for their help with bioinformatics and statistics. We are grateful to T. Gaude and S. Veyrenc for their technical assistance in mosquito rearing and sample preparation. We thank Prof. C. Gauthier (PRABI) and Dr. C. Oger (DTAMB/PRABI) for technical help and/or discussion in the project setup. We also acknowledge the UMR 5558 "Pôle informatique" and the PRABI-AMSB to provide access to their mutualised computational cluster. We thank Prof. V. Marchais and Prof. U. Schlattner for useful comments on the manuscript. We thank Vectorbase (Dr. D. Lawson and Dr. R. MacCallum) for their help with data deposition. We appreciated efforts of the Genespring NGS technical support team for their help with data analysis.

Author details

¹Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), UMR CNRS 5553, Grenoble, France. ²Université Grenoble Alpes, Grenoble, France. ³Environmental and Systems Biology (BEeSy), Université Grenoble Alpes, Grenoble, France. ⁴Vector Biology group, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, UK. ⁵Department of Entomology, University of Sargodha, Sargodha, Pakistan. ⁶Pôle Rhône Alpes de Bioinformatique, Université Lyon 1, Villeurbanne, France.

Received: 7 November 2013 Accepted: 21 February 2014
Published: 5 March 2014

References

- Lounibos LP: **Invasions by insect vectors of human disease.** *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:233–266.
- WHO: **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** In *Fact sheet N 117*; 2009. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.
- WHO: **World Malaria Report.** In *World Health Organization technical report*. Geneva, Switzerland: WHO press; 2012:195. http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2012/report/en/. ISBN 978 92 4 156453 3.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H: **The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes.** *Insect Biochem Mol Biol* 2004, **34**(7):653–665.
- Hemingway J, Ranson H: **Insecticide resistance in insect vectors of human disease.** *Annu Rev Entomol* 2000, **45**:371–391.
- Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David JP: **Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects.** *Insect Biochem Mol Biol* 2013, **43**:407–416.
- Du W, Awolola TS, Howell P, Koekemoer LL, Brooke BD, Benedict MQ, Coetzee M, Zheng L: **Independent mutations in the Rdl locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*.** *Insect Mol Biol* 2005, **14**(2):179–183.
- Kasai S, Ng LC, Lam-Phua SG, Tang CS, Itokawa K, Komagata O, Kobayashi M, Tomita T: **First detection of a putative knockdown resistance gene in major mosquito vector, *Aedes albopictus*.** *Jpn J Infect Dis* 2011, **64**(3):217–221.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, Darriet F, Berge JB, Devonshire AL, Guillet P, Pasteur N, Pauron D: **Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (*kdr*) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s.** *Insect Mol Biol* 1998, **7**(2):179–184.
- Martinez-Torres D, Chevillon C, Brun-Barale A, Bergé JB, Pasteur N, Pauron D: **Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* mosquitoes.** *Pestic Sci* 1999, **55**:1012–1020.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH: **Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids.** *Insect Mol Biol* 2000, **9**(5):491–497.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu A, Marquie M, Raymond M: **The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors.** *Insect Mol Biol* 2004, **13**(1):1–7.
- Feyereisen R: **Insect cytochrome P450.** In *Comprehensive Molecular Insect Science*. Edited by Gilbert LI, Iatrou K, Gill S. Amsterdam, Netherlands: Elsevier; 2005:1–77.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR: **Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics.** *Annu Rev Entomol* 2007, **52**:231–253.
- Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, Bartholomay L, Bidwell S, Caler E, Camara F, Campbell CL, Campbell KS, Casola C, Castro MT, Chandramouliswaran I, Chapman SB, Christley S, Costas J, Eisenstadt E, Feschotte C, Fraser-Liggett C, Guigo R, Haas B, Hammond M, Hansson BS, Hemingway J, Hill SR, Howarth C, Ignell R, Kennedy RC, et al: **Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics.** *Science* 2010, **330**(6000):86–88.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusser DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, de Berardinis V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, et al: **The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*.** *Science* 2002, **298**(5591):129–149.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, Ren Q, Zdobnov EM, Lobo NF, Campbell KS, Brown SE, Bonaldo MF, Zhu J, Sinkins SP, Hogenkamp DG, Amedeo P, Arensburger P, Atkinson PW, Bidwell S, Biedler J, Birney E, Bruggner RV, Costas J, Coy MR, Crabtree J, Crawford M, et al: **Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector.** *Science* 2007, **316**(5832):1718–1723.
- David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ: **Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013, **368**:20120429.
- David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H: **The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, **102**(11):4080–4084.

20. Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne SH, Hemingway J, Black WC, Ranson H: **Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38**(1):113–123.
21. Vontas J, Ranson H, Alphey L: **Transcriptomics and disease vector control.** *BMC Biol* 2010, **8**:52.
22. Chiu TL, Wen Z, Rupasinghe SG, Schuler MA: **Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**(26):8855–8860.
23. Hardstone MC, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Scott JG: **Use of isogenic strains indicates CYP9M10 is linked to permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus*.** *Insect Mol Biol* 2010, **19**(6):717–726.
24. Riverson JM, Irving H, Ndula M, Barnes KG, Ibrahim SS, Paine MJ, Wondji CS: **Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2013, **110**(1):252–257.
25. Oszolák F, Milos PM: **RNA sequencing: advances, challenges and opportunities.** *Nat Rev Genet* 2011, **12**(2):87–98.
26. Wang Z, Gerstein M, Snyder M: **RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics.** *Nat Rev Genet* 2009, **10**(1):57–63.
27. Wilhelm BT, Landry JR: **RNA-Seq-quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing.** *Methods* 2009, **48**(3):249–257.
28. Donnelly MJ, Corbel V, Weetman D, Wilding CS, Williamson MS, Black WC: **Does kdr genotype predict insecticide-resistance phenotype in mosquitoes?** *Trends Parasitol* 2009, **25**(5):213–219.
29. Labbe P, Lenormand T, Raymond M: **On the worldwide spread of an insecticide resistance gene: a role for local selection.** *J Evol Biol* 2005, **18**(6):1471–1484.
30. Bariami V, Jones CM, Poupardin R, Vontas J, Ranson H: **Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(6):e1692.
31. Wood O, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer L, Brooke B: **Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*.** *Parasites Vectors* 2010, **3**:67.
32. Martin-Magniette ML, Aubert J, Cabannes E, Daudin JJ: **Evaluation of the gene-specific dye bias in cDNA microarray experiments.** *Bioinformatics* 2005, **21**(9):1995–2000.
33. Spiess AN, Mueller N, Ivell R: **Amplified RNA degradation in T7-amplification methods results in biased microarray hybridizations.** *BMC Genomics* 2003, **4**(1):44.
34. Bonizzoni M, Afrane Y, Dunn WA, Atieli FK, Zhou G, Zhong D, Li J, Githeko A, Yan G: **Comparative transcriptome analyses of deltamethrin-resistant and -susceptible *Anopheles gambiae* mosquitoes from Kenya by RNA-Seq.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e44607.
35. Poupardin R, Riaz MA, Jones CM, Chandon-Proust A, Reynaud S, David JP: **Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics.** *Aquat Toxicol* 2012, **114**–115:49–57.
36. Riaz MA, Chandon-Proust A, Dauphin-Villemant C, Poupardin R, Jones CM, Strode C, Regent-Kloekner M, David JP, Reynaud S: **Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*.** *Aquat Toxicol* 2013, **126**:326–337.
37. Luplertlop N, Surasombatpattana P, Patramool S, Dumas E, Wasinpiyamongkol L, Saune L, Hamel R, Bernard E, Sereno D, Thomas F, Piquemal D, Yssel H, Briant L, Missé D: **Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following infection with Dengue Virus.** *PLoS Pathog* 2011, **7**(1):e1001252.
38. Dimopoulos G: **Insect immunity and its implication in mosquito-malaria interactions.** *Cell Microbiol* 2003, **5**(1):3–14.
39. Alout H, Ndam NT, Sandeu MM, Djegbe I, Chandre F, Dabire RK, Djogbenou LS, Corbel V, Cohuet A: **Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates.** *PLoS One* 2013, **8**(5):e63849.
40. Rivero A, Vezilier J, Weill M, Read AF, Gandon S: **Insecticide control of vector-borne diseases: when is insecticide resistance a problem?** *PLoS Pathog* 2010, **6**(8):e1001000.
41. Djouaka RF, Bakare AA, Coulibaly ON, Akogbeto MC, Ranson H, Hemingway J, Strode C: **Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria.** *BMC Genomics* 2008, **9**:538.
42. Vontas J, David JP, Nikou D, Hemingway J, Christophides GK, Louis C, Ranson H: **Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization.** *Insect Mol Biol* 2007, **16**(3):315–324.
43. David JP, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandon-Proust A, Reynaud S: **Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology.** *BMC Genomics* 2010, **11**:216.
44. Puinean AM, Foster SP, Oliphant L, Denholm I, Field LM, Millar NS, Williamson MS, Bass C: **Amplification of a cytochrome P450 gene is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*.** *PLoS Genet* 2010, **6**(6):e1000999.
45. Dittmer NT, Kanost MR: **Insect multicopper oxidases: diversity, properties, and physiological roles.** *Insect Biochem Mol Biol* 2010, **40**(3):179–188.
46. Gorman MJ, Dittmer NT, Marshall JL, Kanost MR: **Characterization of the multicopper oxidase gene family in *Anopheles gambiae*.** *Insect Biochem Mol Biol* 2008, **38**(9):817–824.
47. Courjaret R, Lapied B: **Complex intracellular messenger pathways regulate one type of neuronal alpha-bungarotoxin-resistant nicotinic acetylcholine receptors expressed in insect neurosecretory cells (dorsal unpaired median neurons).** *Mol Pharmacol* 2001, **60**(1):80–91.
48. Thany SH, Lenaers G, Raymond-Delpech V, Sattelle DB, Lapied B: **Exploring the pharmacological properties of insect nicotinic acetylcholine receptors.** *Trends Pharmacol Sci* 2007, **28**(1):14–22.
49. Bodereau-Dubois B, List O, Calas-List D, Marques O, Communal PY, Thany SH, Lapied B: **Transmembrane potential polarization, calcium influx, and receptor conformational state modulate the sensitivity of the imidacloprid-insensitive neuronal insect nicotinic acetylcholine receptor to neonicotinoid insecticides.** *J Pharmacol Exp Ther* 2012, **341**(2):326–339.
50. Burmester T, Scheller K: **Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport.** *Naturwissenschaften* 1999, **86**(10):468–474.
51. Jinwal UK, Zakharkin SO, Litvinova OV, Jain S, Benes H: **Sex-, stage- and tissue-specific regulation by a mosquito hexamerin promoter.** *Insect Mol Biol* 2006, **15**(3):301–311.
52. Haunerland NH, Bowers WS: **Binding of insecticides to lipophorin and arylphorin, 2 hemolymph-proteins of *Heliothis zea*.** *Arch Insect Biochem Physiol* 1986, **3**(1):87–96.
53. Buss DS, Callaghan A: **Interaction of pesticides with p-glycoprotein and other ABC proteins: a survey of the possible importance to insecticide, herbicide and fungicide resistance.** *Pest Biochem Physiol* 2008, **90**(3):141–153.
54. Jones CM, Toe HK, Sanou A, Namountougou M, Hughes A, Diabate A, Dabire R, Simard F, Ranson H: **Additional selection for insecticide resistance in urban malaria vectors: DDT resistance in *Anopheles arabiensis* from Bobo-Dioulasso Burkina Faso.** *PLoS One* 2012, **7**(9):e45995.
55. Chandon-Proust A, Bibby J, Regent-Kloekner M, Roux J, Guittard-Crilat E, Poupardin R, Riaz MA, Paine M, Dauphin-Villemant C, Reynaud S, David JP: **The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling.** *Biochem J* 2013, **455**(1):75–85.
56. Swenson TL, Casida JE: **Aldehyde oxidase importance in vivo in xenobiotic metabolism: imidacloprid nitroreduction in mice.** *Toxicol Sci* 2013, **133**(1):22–28.
57. Mitchell SN, Stevenson BJ, Muller P, Wilding CS, Egyir-Yawson A, Field SG, Hemingway J, Paine MJ, Ranson H, Donnelly MJ: **Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(16):6147–6152.
58. Stevenson BJ, Bibby J, Pignatelli P, Muangnoicharoen S, O'Neill PM, Lian LY, Muller P, Nikou D, Steven A, Hemingway J, Sutcliffe MJ, Paine MJ: **Cytochrome P450 6 M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: sequential metabolism of deltamethrin revealed.** *Insect Biochem Mol Biol* 2011, **41**(7):492–502.
59. Irving H, Riverson JM, Ibrahim SS, Lobo NF, Wondji CS: **Positional cloning of rp2 QTL associates the P450 genes CYP6Z1, CYP6Z3 and CYP6M7 with pyrethroid resistance in the malaria vector *Anopheles funestus*.** *Heredity* 2012, **109**(6):383–392.
60. Dai D, Tang J, Rose R, Hodgson E, Bienstock RJ, Mohrenweiser HW, Goldstein JA: **Identification of variants of CYP3A4 and characterization of**

- their abilities to metabolize testosterone and chlorpyrifos. *J Pharmacol Exp Ther* 2001, **299**(3):825–831.
61. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, Goldstein JA: Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics* 2001, **11**(7):597–607.
 62. Eiselt R, Domanski TL, Zibat A, Mueller R, Presecan-Siedel E, Hustert E, Zanger UM, Brockmoller J, Klenk HP, Meyer UA, Khan KK, He YA, Halpert JR, Wojnowski L: Identification and functional characterization of eight CYP3A4 protein variants. *Pharmacogenetics* 2001, **11**(5):447–458.
 63. Li DN, Seidel A, Pritchard MP, Wolf CR, Friedberg T: Polymorphisms in P450 CYP1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol. *Pharmacogenetics* 2000, **10**(4):343–353.
 64. Sata F, Sapone A, Elizondo G, Stocker P, Miller VP, Zheng W, Raunio H, Crespi CL, Gonzalez FJ: CYP3A4 allelic variants with amino acid substitutions in exons 7 and 12: evidence for an allelic variant with altered catalytic activity. *Clin Pharmacol Ther* 2000, **67**(1):48–56.
 65. Bell CG, Beck S: Advances in the identification and analysis of allele-specific expression. *Genome Med* 2009, **1**(5):56.
 66. Gaur U, Li K, Mei S, Liu G: Research progress in allele-specific expression and its regulatory mechanisms. *J Appl Genet* 2013, **54**(3):271–283.
 67. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL: TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009, **25**(9):1105–1111.
 68. Audic S, Claverie JM: The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 1997, **7**(10):986–995.
 69. Benjamini Y, Hochberg Y: Controlling the False Discovery Rate: a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J Royal Stat Soc B* 1995, **57**:289–300.
 70. Benjamini Y, Yekutieli D: The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annu Stat* 2001, **29**(4):1165–1188.
 71. Saeed AI, Bhagabati NK, Braisted JC, Liang W, Sharov V, Howe EA, Li J, Thiagarajan M, White JA, Quackenbush J: TM4 microarray software suite. *Methods Enzymol* 2006, **411**:134–193.

doi:10.1186/1471-2164-15-174

Cite this article as: David et al.: Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics* 2014 **15**:174.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Supplementary Tables

Suppl Table 1. Sequencing and mapping statistics.

	Bora-Bora		Perm-R		Imida-R		Propo-R		Total	
	reads	%	reads	%	reads	%	reads	%	reads	%
replicate 1	66990113	100	68956068	100	60691821	100	72517050	100	269155052	100
	35634800	53,2	32399968	47,0	26992614	44,5	35732209	49,3		
	31355313	46,8	36556100	53,0	33699207	55,5	36784841	50,7		
replicate 2	55699814	83,1	56764487	82,3	51746406	85,3	53573320	73,9	217784027	80,9
	51308928	76,6	53174263	77,1	49210617	81,1	49453233	68,2	203147041	75,5
	43848443	65,5	45611765	66,1	42121682	69,4	42769673	59,0	174351563	64,8
perfect match	43357834	64,7	45295976	65,7	41821852	68,9	42461272	58,6	172936934	64,3
1 mismatch	416731	0,6	266934	0,4	254148	0,4	259317	0,4	1197130	0,4
≥ 2 mismatches	73878	0,1	48855	0,1	45682	0,1	49084	0,1	217499	0,1

Suppl Table 2. Overview of transcriptome re-annotation and novel detection.

	Features location			Total retained features	Covered transcripts	%
	Upstream	Internal	Downstream			
Modified transcripts						
main evidence: spliced reads	837	503	277	5810	3369	17,5
main evidence: distance	1147	899	2145			
Novel Transcription Events						
main evidence: spliced reads	-	577	-	1753	544	2,8
main evidence: distance	-	1176	-			

Transcriptome re-annotation and novel detection were based on reads distribution compared to vectorbase AAEL 1.3 annotation. Novel Transcription Events (NTEs) were detected based on their distance with known transcripts and their read distribution and coverage. For known transcripts, new features may represent new exons or exons with modified boundaries. For NTEs features were referred as internal because they could not be linked to any known transcript.

Suppl Table 3: Cross-validation of transcription levels between RNA-seq and microarrays.

<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-15-174-s6.tiff>

Suppl Table 4: Transcripts differentially expressed after insecticide selection.

<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-15-174-s7.xlsx>

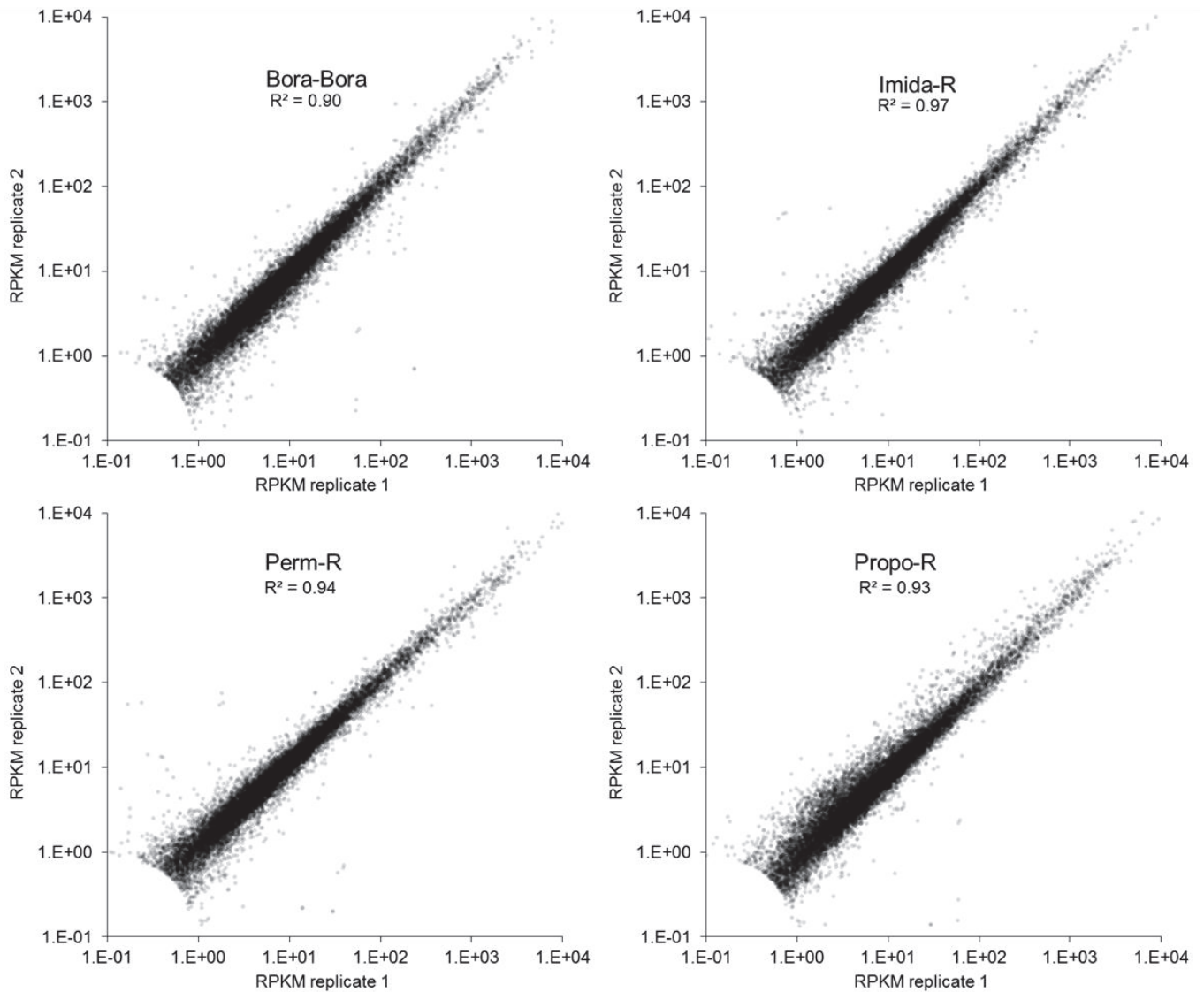
Suppl Table 5: Differential SNPs linked to insecticide selection.

<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-15-174-s8.xlsx>

Supplementary Figures

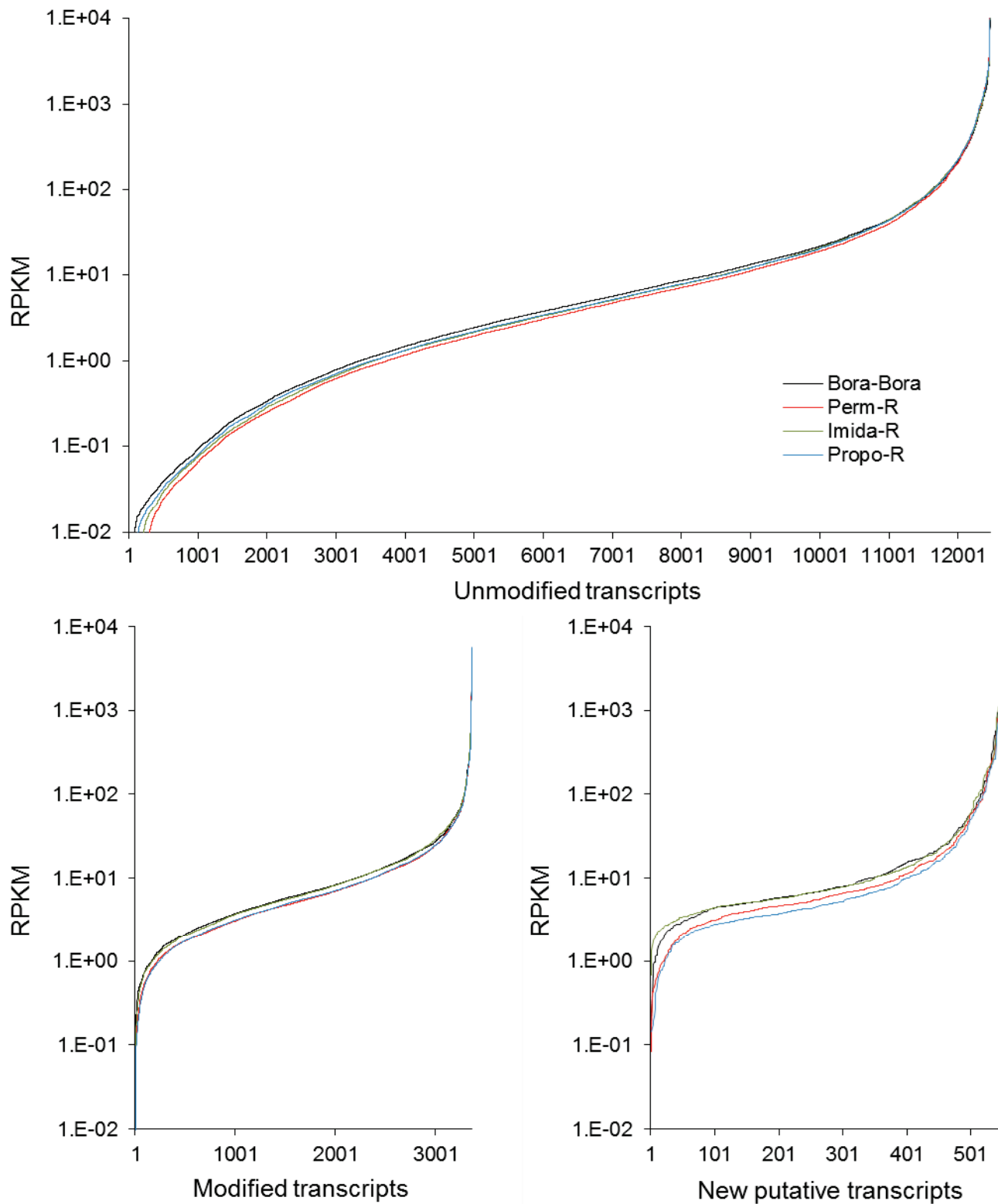
Suppl. Figure 1. RPKM correlation between cDNA library replicates.

Each dot represents one transcript. Only transcripts showing more than 0.5 RPKM are shown.



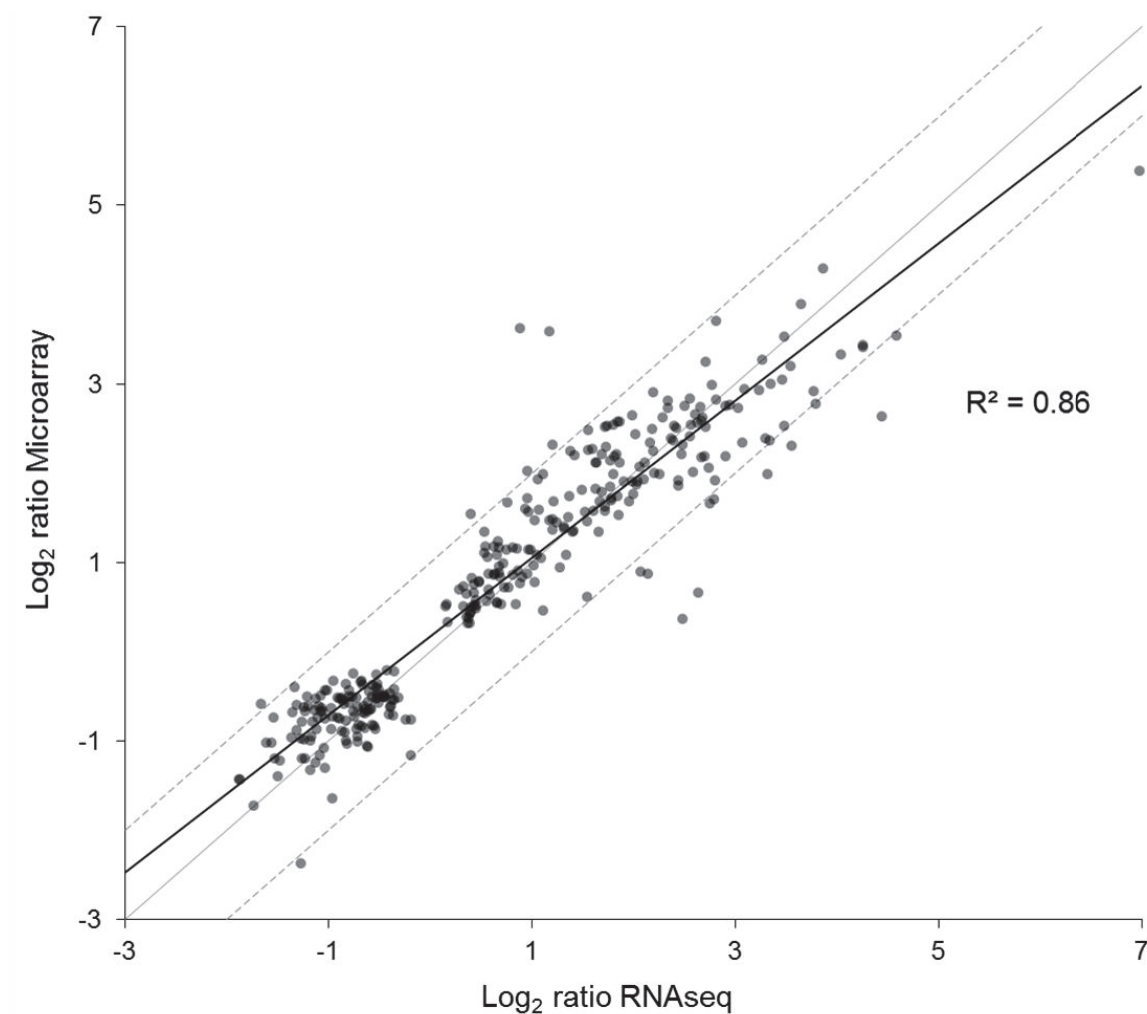
Suppl. Figure 2. Comparison of read coverage across strains.

Read coverage are indicated for each strain as RPKM (log scale). Coverage distributions are compared for unmodified transcripts (top), re-annotated transcripts (bottom left), and new putative transcripts (bottom right).



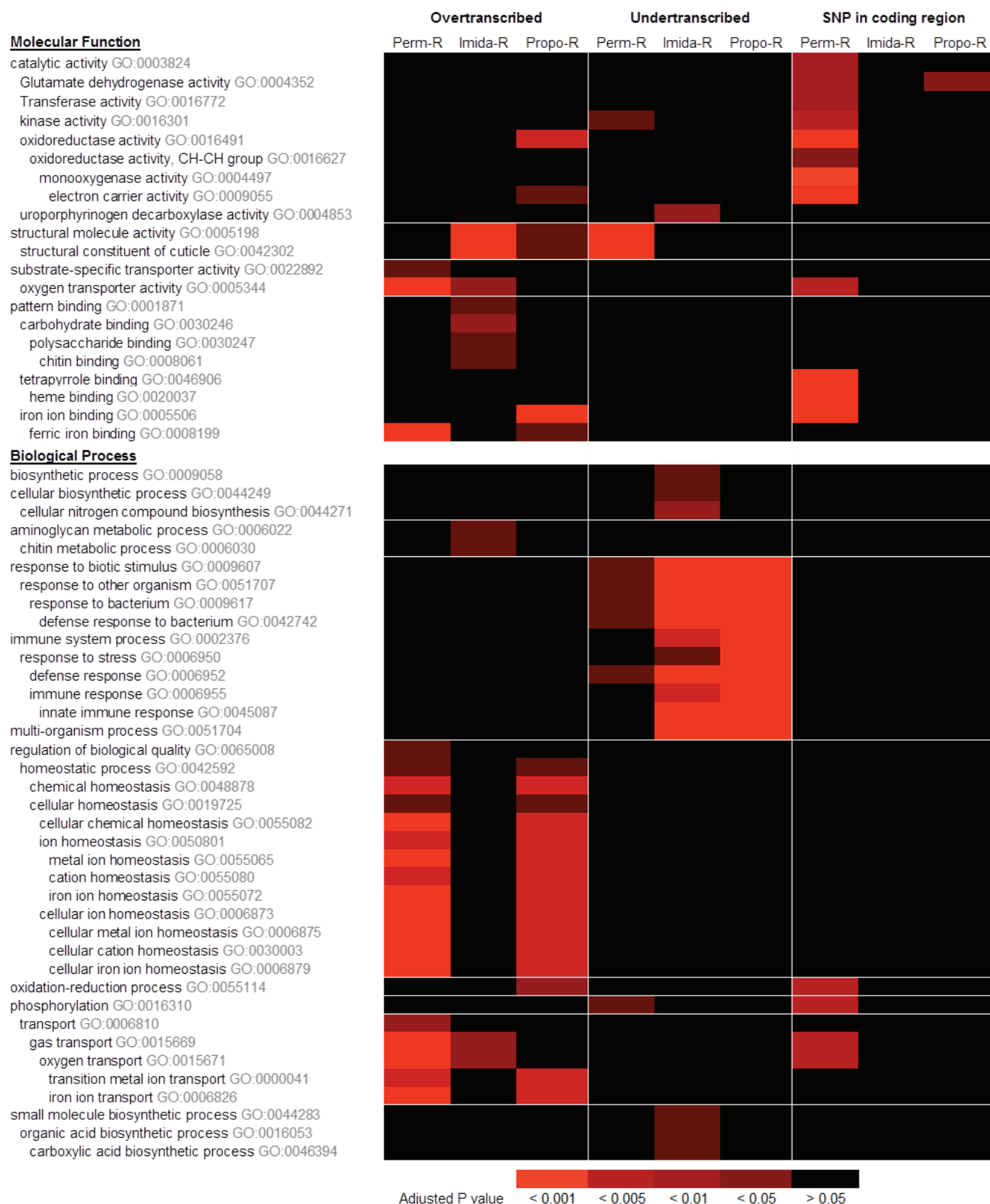
Suppl. Figure 3. Cross-validation of transcription levels between RNA-seq and microarrays.

Comparison is based on transcription data obtained from the Imida-R strain versus susceptible strain. RNA-seq and microarray data were obtained from the same generation. Correlation was performed on the 326 transcripts showing a significant differential transcription level in both studies. Solid grey line represents an equal transcription ratio between both techniques. Grey dashed lines represent a two-fold variation.



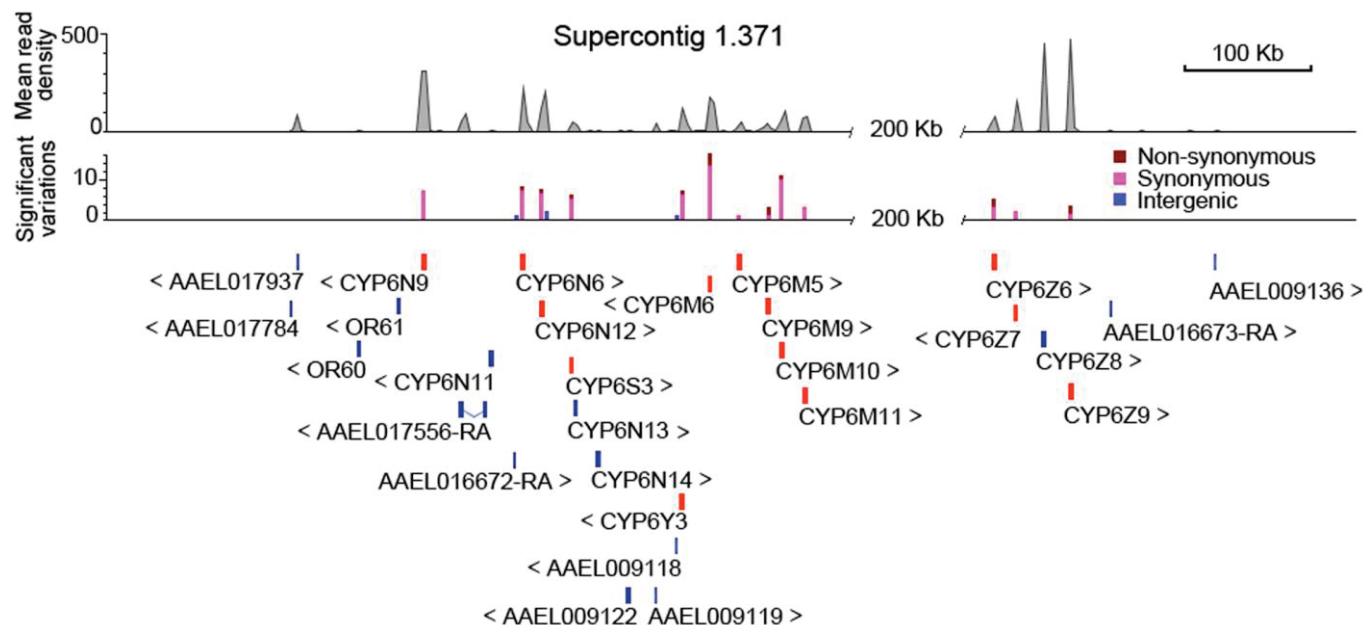
Suppl. Figure 4. GO terms enrichment analysis.

Analysis was performed on all transcripts significantly differentially expressed or affected by differential SNPs in insecticide-selected strains as compared to the susceptible strain. GO terms associated to each transcript were extracted from Vectorbase. GO terms showing adjusted P values < 0.05 were considered significantly enriched.



Suppl. Figure 5. Differential SNPs linked to permethrin selection in supercontig 1.371.

Transcripts location and read coverage are indicated. Transcripts showing differential SNPs in the Perm-R strain as compared to the susceptible strain are shown in red. For each transcript, the number of differential SNPs and their predicted genic effects are indicated.



Chapitre III:

Etude des bases génomiques de la résistance au pyréthriinoïde deltaméthrine par enrichissement génomique et séquençage haut débit (DNA-seq).

I. Contexte scientifique

L'identification des mutations des protéines ciblées par les insecticides et la caractérisation de leur rôle dans la résistance ont représenté des avancées majeures dans la compréhension et le suivi de la résistance des moustiques aux insecticides chimiques. Ces mutations, telles que les mutations *Kdr* affectant le canal sodium voltage dépendant ciblé par le DDT et les pyréthriinoïdes, sont maintenant bien décrites (Liu 2015). Ces **marqueurs moléculaires génomiques** (marqueurs ADN) sont très utiles pour suivre la résistance sur le terrain, car contrairement aux marqueurs ARN ou protéiques, ils sont plus faciles à mettre en œuvre. En effet, l'ADN génomique est une molécule chimiquement stable (contrairement à l'ARNm) son extraction et son stockage sont réalisables sur des moustiques individuels permettant le suivi de la fréquence des allèles de résistance dans les populations. De plus, contrairement aux marqueurs ARN et protéiques, ces marqueurs génomiques ne sont pas affectés par l'état physiologique de l'individu (âge, stade de développement), la nature des tissus et organes étudiés ou bien le statut physiologique des individus en réponse à leur environnement (température, humidité, statut nutritionnel, présence de molécules xénobiotiques, etc...). Il est ainsi possible de les caractériser par simple PCR diagnostique en utilisant des couples d'amorces spécifiques de chaque allèle (AS-PCR pour allele specific PCR), par qPCR par comparaison de la courbe de fusion (Meltcurve analysis) ou bien en utilisant des sondes spécifiques de chaque allèle (sondes spécifiques de type TaqMan ou similaires) ou enfin par séquençage direct de la région concernée (Bregues et al. 2003; Saavedra-Rodriguez et al. 2007). Néanmoins, les marqueurs génomiques des mutations de cible ne permettent pas de suivre les autres mécanismes de résistance tels que la **résistance métabolique**, la résistance par séquestration ou bien la résistance cuticulaire bien que ces mécanismes contribuent souvent de manière considérable au phénotype de résistance. Ces mécanismes de résistance sont en général appréhendés par l'intermédiaire d'études

d'expression utilisant des techniques de transcriptomique par puce à ADN ou bien ciblant certains gènes candidats par RT-qPCR. Néanmoins, ces approches sont lourdes à mettre en place car elles se heurtent aux difficultés inhérentes aux études basées sur l'ARN messager (dégradation rapide, stockage et expédition difficiles, variations non contrôlées selon le statut physiologique des individus, quantité insuffisante pour travailler au niveau individuel, ...). Or la **sur-expression constitutive** d'un gène est théoriquement la conséquence de **modifications génomiques**, comme par exemple une **augmentation du nombre de copie** d'un gène ou bien des **mutations dans les régions *cis/trans* régulatrices** du gène. Le génome des moustiques étant riche en éléments transposables connus pour favoriser les duplications de gènes, le rôle des amplifications géniques dans la sur-expression des gènes de résistance semble probable. Toutefois, cela n'a encore jamais été étudié de manière exhaustive en relation avec la résistance aux insecticides.

Par ailleurs, les résultats obtenus au cours de l'étude précédente par RNA-seq (Chapitre II) suggèrent le rôle des modifications qualitatives (mutations ponctuelles non-synonymes) des enzymes de détoxification dans la résistance métabolique, incitant à étudier ce phénomène de manière plus approfondie par **DNA-seq**.

II. Objectifs de l'étude et approches utilisées

Dans ce contexte, cette seconde étude visait à utiliser le séquençage ADN haut débit pour identifier de nouveaux marqueurs génomiques de la résistance aux insecticides pyréthrinoides chez le moustique *Ae. aegypti*, notamment ceux liés à la sur-expression de certaines enzymes de détoxification ou bien à une modification de leur conformation en lien avec une capacité accrue à dégrader l'insecticide. L'objectif secondaire de cette étude était d'étudier **l'universalité de ces marqueurs** dans différentes populations résistantes échantillonnées sur plusieurs continents. L'insecticide pyréthrinoïde deltaméthrine a été choisi pour cette étude car il est actuellement le plus utilisé pour le contrôle des moustiques adultes dans les pays tropicaux.

La recherche de marqueurs génomiques de la résistance nécessite le séquençage de l'ADN génomique d'un grand nombre d'individus résistants et sensibles. Malgré la puissance des nouvelles technologies de séquençage, un tel screening génomique est difficile à mettre en œuvre à l'échelle du génome entier. En effet, le séquençage du génome entier d'*Ae. aegypti* (> 3 Gb) à une profondeur suffisante et sur un grand nombre d'individus visant à générer des

données fiables de polymorphismes entre plusieurs populations résistantes et sensible serait beaucoup trop couteux et générerait une quantité de données énorme, difficile à analyser.

Or, les avancées majeures des technologies de séquençage ADN ont permis de mettre au point une technique permettant de cibler certaines régions génomiques afin de ne séquencer que certaines régions d'intérêt du génome. Cette technique, dite de « **capture d'exon** », ou d'« **enrichissement génomique** » développée par Agilent (SureSelect®) (**Figure 17**) se prête particulièrement bien à notre cas d'étude car les gènes impliqués dans la résistance ne représentent qu'une fraction du génome et peuvent facilement être identifiés par bio-informatique. En effet, les mécanismes et les grandes familles de gènes impliqués dans la résistance sont maintenant bien connus, et grâce à l'annotation du génome d'*Ae. aegypti* il est possible d'extraire *in silico* les informations utiles à la création des sondes de captures nécessaires à l'étape d'enrichissement génomique.

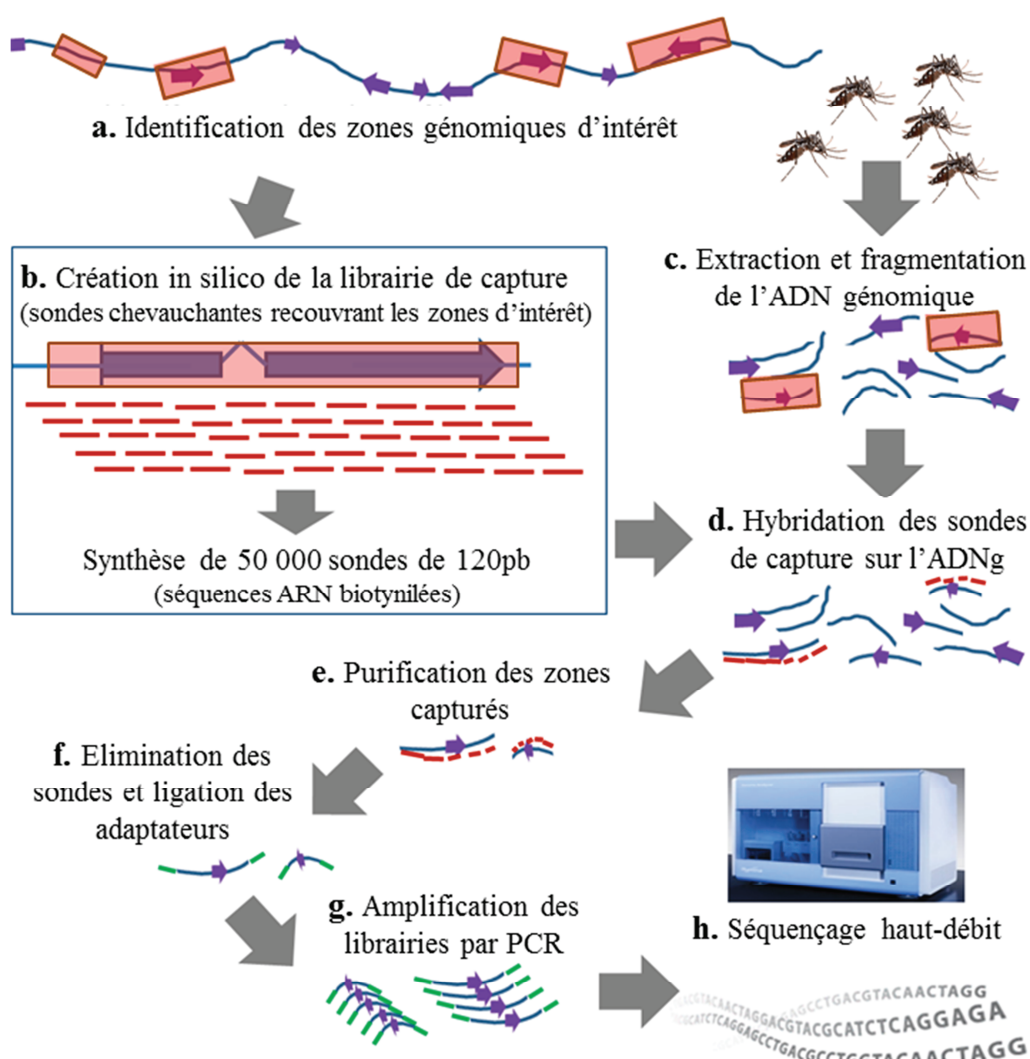


Figure 17: Schéma des différentes étapes d'une étude par DNA-seq ciblé par la technologie SureSelect®

Ainsi, la première étape de cette étude a consisté à identifier les gènes d'intérêt pour cette étude (**Figure 17 a.**). Près de **800 gènes** appartenant à différentes familles ont été identifiés (**Figure 18**), puis les séquences codantes des transcrits (CDS) correspondant à ces gènes ont été extraites du génome d'*Ae aegypti*. L'ensemble de ces régions génomiques d'intérêt représentait une longueur de génome à capturer d'environ 2.5 MB.

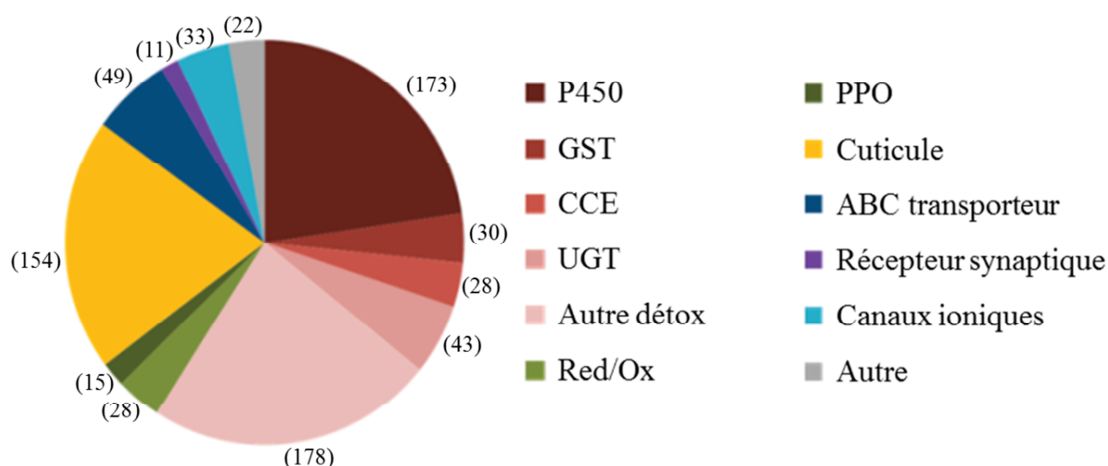


Figure 18: Catégories fonctionnelles des gènes capturés dans la Publication II. Le nombre de gènes capturés pour chaque catégorie est indiqué entre parenthèses.

A la suite de cette analyse de bio-informatique en amont, des sondes de captures ARN couvrant ces zones génomiques d'intérêt (UTRs et exons des gènes ciblés) avec une couverture d'environ 3X ont été synthétisés par la compagnie Hybrigenics-Imaxio (**Figure 17b.**). Puis, les échantillons d'ADN génomique issus de femelles adultes des différentes populations de moustiques à étudier ont été fragmentés puis hybridés avec les sondes ARN de capture (**Figure 17 c. et d.**). Cette hybridation spécifique permet d'isoler et de purifier les zones génomiques d'intérêt grâce au système d'interaction biotine/streptavidine (**Figure 17e.**). Des bibliothèques de séquençage sont alors préparées à partir de ces échantillons capturés (**Figure 17 f. et g.**). Chaque bibliothèque est ensuite séquencée en multiplex sur séquenceur illumina (**Figure 17h.**).

Les échantillons d'ADN utilisés pour cette étude proviennent de populations naturelles d'*Ae. aegypti* collectées en **Thaïlande** et en **Guyane Française**, présentant des niveaux de résistance élevés à la deltaméthrine. Nous avons aussi intégré à cette étude une population de **laboratoire** (population Delta-R) sélectionnée pendant plusieurs générations avec la deltaméthrine, non porteuse des différentes mutations *Kdr*. Enfin, des populations sensibles

génétiqement proches des populations résistantes issues de chaque localité ont également été échantillonnées afin d’obtenir une référence sensible locale et de minimiser le nombre de faux positifs liés aux différences de fond génétique entre populations.

Afin d’appréhender au mieux les modifications génomiques associées avec la résistance à la deltaméthrine, un **phénotypage fin** des femelles adultes a été réalisé (**Figure 19**). Les populations résistantes ont été ségrégées en deux sous populations, l’une composée des individus les moins résistants à la deltaméthrine (**Pop-R-**, mort à la Dose Létale 25%) et l’autre composée des individus les plus résistants (**Pop-R+**, survivants à la Dose Létale 75%).

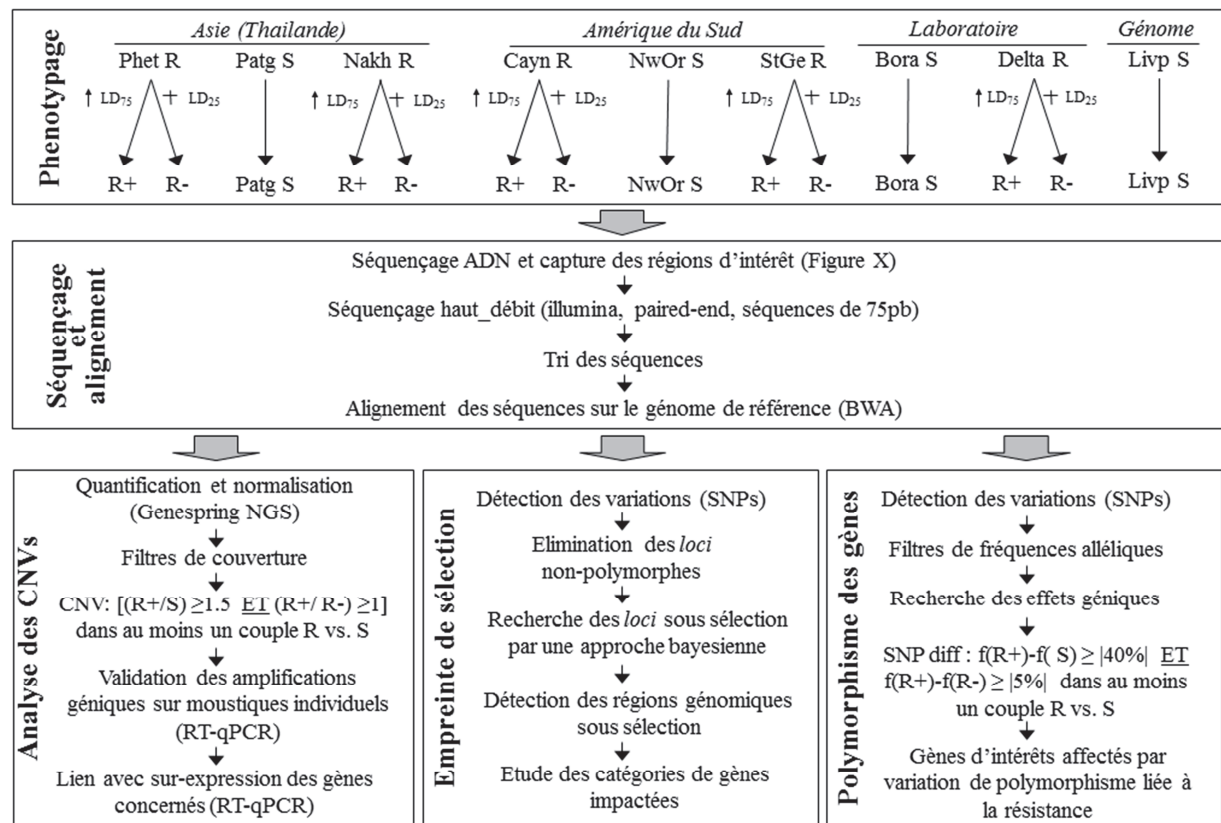


Figure 19: Organigramme de l’étude aboutissant à la Publication II.

L'enrichissement génomique et le séquençage ont ensuite été réalisés sur des extraits d'ADN issus de 130 individus pour chaque population sensible (S) et chaque sous-population résistante (R+ et R-). L'analyse des données (**Figure 19**) a été réalisée par zone géographique (Asie, Amérique du Sud et Laboratoire). Cette analyse visait à :

- identifier les variations du nombre de copies de gènes (CNVs) liées à la résistance par analyse différentielle de la couverture de séquençage entre populations sensibles et résistantes
- identifier des variations de polymorphisme liées à la résistance, tout d'abord par recherche de signatures de sélection sur les zones génomiques capturées puis par identification des variations de polymorphisme fortement associées à la résistance
- estimer le degré d'universalité ou de spécificité de ces marqueurs aux échelles régionale et locale.

III. Discussion des principaux résultats

Le DNA-seq ciblé pour l'identification de nouveaux marqueurs de résistance

L'approche technologique utilisée a permis de séquencer avec succès l'ensemble des échantillons étudiés et de couvrir la plupart des gènes ciblés. Près de 70% des séquences obtenues ont montré une **qualité de séquençage élevée** (score de qualité Phred > 30). Après filtrage sur la qualité, plus de 68 % des séquences ont pu être mappées sur le génome d'*Ae. aegypti* sans ambiguïté. La profondeur moyenne de séquençage s'est révélée supérieure à nos attentes (~80X) et homogène entre échantillon, confirmant la robustesse du système d'enrichissement Sureselect® développé par Agilent.

Une analyse globale de la couverture des régions capturées entre les échantillons a fait rapidement apparaître que certaines régions montraient une **couverture extrêmement élevée** chez certaines populations résistantes, suggérant des événements d'**amplifications géniques**. Par la suite, une analyse différentielle plus fine de la couverture normalisée de chaque gène entre échantillons a permis d'identifier plus de 40 gènes montrant une élévation significative du nombre de copies en rapport avec la résistance à la deltaméthrine. La plupart de ces gènes codent pour des cytochromes P450s, des estérases et GSTs.

Une analyse du polymorphisme des gènes capturés a ensuite permis d'identifier des **mutations non-synonymes** fortement associées à la résistance à la deltaméthrine chez *Ae. aegypti*.

Marqueurs génomiques de la résistance

Amplifications géniques

Les variations de nombre de copies (CNV) en liens avec la résistance identifiées dans cette étude impactent des gènes dont la plupart ont déjà été identifiés comme sur-exprimés chez des populations résistantes par des approches transcriptomiques (Strode et al. 2008; Marcombe et al. 2012; Saavedra-Rodriguez et al. 2012, 2014; Poupardin et al. 2014). Certains d'entre eux codent pour des cytochromes P450 ayant déjà été validés comme capables de métaboliser les pyréthrénoïdes. L'amplification génique semble donc jouer un rôle important dans la sur-expression des enzymes de détoxification impliquées dans la résistance aux PYRs. Ces amplifications géniques apparaissent comme de **très bons marqueurs** génomiques de la résistance du fait de leur facilité de détection par PCR quantitative sur moustiques individuels.

Les gènes affectés par ces amplifications sont **regroupés** en clusters génomiques, suggérant que les événements de duplications affectent de larges portions chromosomiques, et que ces duplications peuvent ensuite être sélectionnées par les insecticides. Ainsi, tous les gènes amplifiés ne sont alors pas forcément directement impliqués dans la résistance, mais peuvent apparaître comme tel car faisant partie d'un cluster de gènes amplifié. Les profils d'amplification de ces clusters semblent conservés entre populations d'une même région géographique, mais différent selon les continents. Ceci suggère l'influence du **fond génétique** des populations ancestrales, de leur **environnement local** ainsi que de l'historique des traitements insecticides sur la sélection des événements d'amplification. En d'autres termes, il apparaît que la plupart des amplifications géniques associées à la résistance métabolique à la deltaméthrine ne sont **pas universels** et que la nature des gènes sélectionnés dépend fortement du contexte local.

Enfin, le géotypage de plusieurs individus de chaque population nous a permis de montrer une faible association génétique entre les amplifications géniques liées à la résistance et la présence des mutations *Kdr*. Ainsi, même si les mutations de cible et la résistance métabolique coexistent généralement dans les populations résistantes, ils ne sont pas toujours

associés au niveau individuel suggérant que la recombinaison génétique et l'addition des coûts engendrés par ces adaptations empêchent leur association systématique.

Variations de polymorphisme

Une forte **empreinte de sélection** a été détectée par l'approche bayésienne, portant sur des régions génomiques riches en gènes candidats à la résistance. Une analyse fine des variations les plus associées au phénotype de résistance a permis de dégager de potentiels bons marqueurs de résistance. Ces variations d'intérêt touchent des gènes appartenant aux CCEs, à la famille des *CYP6s*, à la sous-famille des *CYP9Js*, avec notamment *CYP9J26* déjà validé comme capable de dégrader les PYRs (Stevenson et al. 2012). Plusieurs variations dans les estérases CCEAE3A et CCEAE4A sont également fortement sélectionnées en lien avec le phénotype à la deltaméthrine. Enfin, les autres variations observées affectent des catégories de gènes rarement décrites mais parfois suspectées de jouer un rôle dans la résistance des insectes, comme les UDPGTS et les ABC transporteurs (Huang et al. 2008; Fossog Tene et al. 2013; Dermauw et Van Leeuwen 2014).

De manière globale, nos données semblent confirmer le rôle important des cytochromes P450 dans la résistance aux insecticides pyréthrinoïdes chez les moustiques. Ainsi ces enzymes représentent la majorité de gènes amplifiés (25/41) et apparaissent aussi fréquemment impactées par des mutations non-synonymes. Par ailleurs, trois estérases CCEAE6A, CCEAE4A et CCEAE3A ont été retrouvées surexprimées, affectées par des CNVs et par plusieurs mutations non-synonymes dans notre étude. CCEAE6A et CCEAE3A ont par ailleurs été retrouvées amplifiées et surexprimées en lien avec la résistance au téméphos chez *Ae. albopictus* (Grigoraki et al. 2015) et chez *Aedes aegypti* (Poupardin et al. 2014). Ces estérases sont ainsi impliquées dans les phénotypes de résistances aux PYRS et aux OPs, soulevant ainsi l'hypothèse d'un mécanisme de **résistance multiple** ou **croisée** avec d'autres insecticides (e.g. organophosphorés), difficile à vérifier à travers notre design expérimental. Ainsi, une des limitations majeures de cette étude réside dans le fait que seul le phénotypage à la deltaméthrine a été réalisé. En effet, la connaissance des niveaux de résistance à différents insecticides ainsi que de l'histoire des traitements insecticides sur ces populations aurait permis de déterminer de manière plus robuste les évènements de résistance croisée et/ou multiple.

Conclusion

L'enrichissement génomique couplé au séquençage ADN haut débit apparaît très bien adapté à l'étude des bases génomiques de la résistance des moustiques aux insecticides car les grands mécanismes et les familles de gènes impliquées sont bien connues. Une telle approche offre l'avantage de générer une très forte couverture de séquençage pour un coût modeste, permettant ainsi d'étudier finement les CNVs et variations de polymorphisme en lien avec la résistance chez le moustique.

Les **CNVs** apparaissent comme de bons marqueurs de la résistance métabolique (plus grande facilité d'utilisation que les marqueurs ARN) et offrent donc de bonnes perspectives à court terme pour le développement d'outils moléculaires diagnostiques de ce type de résistance. Plusieurs **variations de polymorphisme** ont été identifiées comme fortement liées à la résistance à la deltaméthrine. Bien qu'une étape de validation soit nécessaire pour vérifier l'association de ces variations avec la résistance à la deltaméthrine (génétique quantitative (QTL) ou validation fonctionnelle), de tels marqueurs génomiques sont assez facilement détectables dans des populations naturelles et représentent une avancée majeure pour le suivi des différents mécanismes de résistance.

Toutefois, d'autres types de marqueurs restent encore à étudier comme par exemple les variations de polymorphisme dans les **régions promotrices** régulant la sur-expression de certains gènes de détoxification chez les populations résistantes. La recherche de ce genre de marqueurs reste aujourd'hui difficile car elle nécessite de **croiser** des données d'expression avec des données de polymorphisme à l'extérieur des gènes (régions régulatrice). Le chapitre suivant tentera d'initier cette recherche par intégration de données de polymorphisme issues de DNA-seq avec des données d'expression générées par RNA-seq.

Publication II:

Titre: Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing.

Auteurs: Frederic Faucon, Isabelle Dusfour, Thierry Gaude, Vincent Navratil, Frederic Boyer, Fabrice Chandre, Patcharawan Sirisopa, Kanutcharee Thanispong, Waraporn Juntarajumnong, Rodolphe Poupardin, Theeraphap Chareonviriyaphap, Romain Girod, Vincent Corbel, Stephane Reynaud and Jean-Philippe David

Année de publication : 2015

Journal de publication : Genome Research n° 25

Contribution personnelle : l'échantillonnage de populations de terrain a été réalisé par les collaborateurs de l'Institut pasteur de la Guyane ainsi que ceux de l'IRD et de l'Université Kasetsart de Thaïlande, que j'ai eu l'occasion d'épauler sur place pour certaines populations. J'ai ensuite réalisé l'ensemble des manipulations et analyses présentées dans cet article. J'ai également participé à la rédaction de l'article et à la mise en forme des figures.

Publication II :

Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing.

Research

Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing

Frederic Faucon,^{1,2,3} Isabelle Dusfour,⁴ Thierry Gaudé,^{1,2,3} Vincent Navratil,⁵ Frederic Boyer,^{1,2,3} Fabrice Chandre,⁶ Patcharawan Sirisopa,^{7,8} Kanutcharee Thanispong,⁹ Waraporn Juntarajumnong,^{7,8} Rodolphe Poupardin,¹⁰ Theeraphap Chareonviriyaphap,^{7,8} Romain Girod,⁴ Vincent Corbel,^{6,7,8} Stephane Reynaud,^{1,2,3} and Jean-Philippe David^{1,2,3}

¹Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), CNRS, UMR 5553, 38041 Grenoble Cedex 9, France; ²Université Grenoble-Alpes, 38041 Grenoble Cedex 9, France; ³Environmental and Systems Biology (BEeSy), Université Grenoble-Alpes, 38041 Grenoble Cedex 9, France; ⁴Unité d'Entomologie Médicale, Institut Pasteur de la Guyane, 97306 Cayenne Cedex, France; ⁵Pôle Rhône Alpes de Bioinformatique, Université Lyon 1, 69100 Villeurbanne, France; ⁶Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Maladies Infectieuses et Vecteurs, Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle (IRD 224-CNRS 5290 UM1-UM2), 34394 Montpellier Cedex 5, France; ⁷Department of Entomology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Lat Yao Chatuchak Bangkok 10900, Thailand; ⁸Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Kasetsart University Institute for Advanced Studies, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand (CASAF, NRU-KU, Thailand); ⁹Bureau of Vector Borne Diseases, Department of Disease Control, Ministry of Public Health, Mueang, Nonthaburi 11000, Thailand; ¹⁰Vector Biology Group, Liverpool School of Tropical Medicine, L35QA Liverpool, United Kingdom

The capacity of mosquitoes to resist insecticides threatens the control of diseases such as dengue and malaria. Until alternative control tools are implemented, characterizing resistance mechanisms is crucial for managing resistance in natural populations. Insecticide biodegradation by detoxification enzymes is a common resistance mechanism; however, the genomic changes underlying this mechanism have rarely been identified, precluding individual resistance genotyping. In particular, the role of copy number variations (CNVs) and polymorphisms of detoxification enzymes have never been investigated at the genome level, although they can represent robust markers of metabolic resistance. In this context, we combined target enrichment with high-throughput sequencing for conducting the first comprehensive screening of gene amplifications and polymorphisms associated with insecticide resistance in mosquitoes. More than 760 candidate genes were captured and deep sequenced in several populations of the dengue mosquito *Ae. aegypti* displaying distinct genetic backgrounds and contrasted resistance levels to the insecticide deltamethrin. CNV analysis identified 41 gene amplifications associated with resistance, most affecting cytochrome P450s overtranscribed in resistant populations. Polymorphism analysis detected more than 30,000 variants and strong selection footprints in specific genomic regions. Combining Bayesian and allele frequency filtering approaches identified 55 nonsynonymous variants strongly associated with resistance. Both CNVs and polymorphisms were conserved within regions but differed across continents, confirming that genomic changes underlying metabolic resistance to insecticides are not universal. By identifying novel DNA markers of insecticide resistance, this study opens the way for tracking down metabolic changes developed by mosquitoes to resist insecticides within and among populations.

[Supplemental material is available for this article.]

Mosquitoes are vectors of numerous human diseases, representing a major threat for public health worldwide (Lounibos 2002). Dengue and Chikungunya viruses are both transmitted by the mosquito *Aedes aegypti* and represent a burden in more than 100 countries putting more than 2.5 billion people at risk (WHO 2009, 2014). Since the Second World War, chemical insecticides have been massively used for controlling vector populations and reducing disease transmission, but their efficacy is now threatened

by resistance mechanisms developed by mosquitoes. Insecticide resistance is widespread in *Ae. aegypti* and affects most insecticides used for vector control (Ranson et al. 2010). Resistance to pyrethroid insecticides, the primary insecticide family used against adult mosquitoes, is particularly worrying in the context of the re-emergence of dengue and other arboviruses worldwide (Bhatt et al. 2013). Although attempts are made to develop new insecticides or alternative mosquito control strategies (Scholte et al. 2004; Lacey 2007; Hoffmann et al. 2011; Walker et al. 2011; Harris et al. 2012), their large-scale implementation in tropical

Corresponding author: jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr

Article published online before print. Article, supplemental material, and publication date are at <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.189225.115>. Freely available online through the *Genome Research* Open Access option.

© 2015 Faucon et al. This article, published in *Genome Research*, is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

regions will require at least a decade. Until this, characterizing molecular mechanisms underlying resistance is crucial for tracking down resistance alleles and improving resistance management strategies (Corbel et al. 2013).

Resistance to pyrethroids can be the consequence of various mechanisms, such as nonsynonymous mutations affecting the voltage-gated sodium channel targeted by these insecticides, i.e., knockdown resistance (*kdr*) mutations, a lower insecticide penetration, its sequestration, or its biodegradation (metabolic resistance) (Hemingway et al. 2004; Li et al. 2007). *Kdr* mutations and metabolic resistance are known as the two primary resistance mechanisms in mosquitoes. Several *kdr* mutations have been identified in *Ae. aegypti*, and the association between the V1016G/I and the F1534C mutations and pyrethroid resistance has been confirmed (Brenques et al. 2003; Saavedra-Rodriguez et al. 2007; Yanola et al. 2011). Monitoring the frequency of these mutations in field populations is possible through simple DNA-based diagnostic assays and provides key data for resistance management strategies.

Metabolic resistance is far less understood, although this type of resistance is frequent and often accounts for a significant part of the resistance phenotype (Li et al. 2007; Nkya et al. 2013). Such a resistance mechanism is caused by an increased activity of detoxification enzymes. These detoxification enzymes include cytochrome P450 monooxygenases (P450s or CYPs for genes), carboxy/cholinesterases (CCEs), glutathione S-transferases (GSTs), and UDP-glycosyl-transferases (UDPGTs), although other families can be involved (Hemingway et al. 2004; David et al. 2013). Their high diversity (roughly 300 genes in *Ae. aegypti*) and the complexity of insecticide biodegradation pathways make the identification of those conferring resistance challenging. Theoretically, metabolic resistance can be the consequence of an increased expression of one or multiple detoxification enzymes capable of metabolizing the insecticide and/or the selection of variants showing a higher insecticide metabolism rate due to conformational modifications. Because overexpression is frequently associated with overtranscription, most candidate genes were identified based on their differential transcription in resistant populations compared to susceptible counterparts using transcriptomics (for review, see David et al. 2013). Although subjected to inherent difficulties associated with gene expression studies (e.g., RNA handling and degradation, uncontrolled variation across time, tissues, and populations), these approaches identified several detoxification enzymes overtranscribed in resistant populations, some of them being later validated as pyrethroid metabolizers (for review, see Vontas et al. 2012; David et al. 2013). Although these approaches proved their value for identifying metabolic resistance genes, they failed to pinpoint the genomic changes associated to their overexpression. In addition, because a limited quantity of mRNA can be extracted from a single mosquito, these studies were conducted at the population level without estimating the frequency of resistant alleles within populations. A constitutive overtranscription can be the consequence of an up-regulation controlled by *cis/trans* genomic regulatory elements or an increased gene copy number (Li et al. 2007). Although gene amplifications have been associated with the overtranscription of a few pyrethroid resistance genes in mosquitoes (Wondji et al. 2009; Itokawa et al. 2010, 2011; Bariami et al. 2012), no comprehensive screening of gene amplifications linked to insecticide resistance has ever been conducted. Considering the central role of copy number variation (CNV) in adaptations associated with a “gene dosage” effect (for review, see Kondrashov 2012) and the richness of *Ae. aegypti* genome in transposable ele-

ments known to favor duplication events (Nene et al. 2007), conducting a comprehensive screening of gene amplifications associated with insecticide resistance may allow identifying reliable DNA markers of metabolic resistance. Besides, most genes linked to metabolic resistance were identified based on their differential expression while the importance of nonsynonymous changes affecting detoxification enzymes have clearly been neglected by molecular screenings. As for gene amplifications, these polymorphisms are of high interest for monitoring the dynamics of insecticide resistance mechanisms among and within mosquito populations.

In this context, the present study aimed at combining the target enrichment technology with high-throughput sequencing for identifying gene amplifications and polymorphisms linked to pyrethroid resistance in the dengue vector, *Ae. aegypti*. More than 760 genes, including those encoding for detoxification enzymes, cuticle proteins, ATP-binding cassette (ABC) transporters, neurotransmitter receptors, and voltage-gated channels, were captured and deep sequenced in several susceptible and pyrethroid-resistant populations from three geographical regions (Asia, South America, and laboratory populations). After phenotyping populations for resistance to the pyrethroid deltamethrin and segregating most resistant individuals, gene amplifications and polymorphisms associated with deltamethrin resistance were identified by deep targeted sequencing of large pools of individuals. Gene amplifications were validated on individual mosquitoes, and their impact on transcription levels were validated. Polymorphism data were first used to identify genomic regions under selection through a hierarchical Bayesian approach taking into account population structure. Then, nonsynonymous variants strongly linked to deltamethrin resistance were identified by combining those identified by the Bayesian approach and those displaying allele frequencies mostly associated with resistance. Quantitative PCR assays were used for cross validating polymorphism data and studying the association between gene amplifications and known target-site mutations. Results are discussed in regard to known insecticide resistance mechanisms and the identification of novel DNA markers of insecticide resistance.

Results

Deltamethrin resistance levels

Bioassays on adult females revealed a broad range of resistance to deltamethrin across populations (Table 1). Exposing mosquitoes for 1 h to various doses of insecticide showed that the lethal dose killing 50% of individuals (LD₅₀) varied up to 750-fold between susceptible populations and the most resistant populations from French Guiana. Resistant populations from Thailand showed an intermediate resistance level (about 250-fold), and the laboratory selected population showed a slight resistance (approximately fivefold). These different resistance levels were confirmed by WHO diagnostic assays, in which the time necessary to knock down 50% of individuals (KDT₅₀) varied from 11 min for susceptible populations to >8 h for the most resistant ones.

Sequencing metrics and coverage

The use of target enrichment technology followed by multiplexed Illumina sequencing allowed obtaining an average of 4.35 million 75-bp reads per sample (Supplemental Table 1). Filtering them according to read pairing, sequence quality, and mapping quality

Variants associated with insecticide resistance

Table 1. Deltamethrin resistance levels

Population	Group	Resistance level	KDT ₅₀ ^a	KDT ₅₀ 95% CI	LD ₅₀ ^b	R+/R- segregation	
						LT ₂₅ (min) ^c	LT ₇₅ (min) ^c
Livp S	Genome	Susceptible	11.5	10.8–12.1	0.001	—	—
Bora S	Laboratory	Susceptible	12.1	11.6–12.7	0.001	—	—
Delta R	Laboratory	Slightly resistant	14.2	13.5–15.0	0.005	30	80
Patg S	Thailand	Susceptible	17.0	15.1–19.2	0.001	—	—
Phet R	Thailand	Resistant	98.2	91.4–106.7	0.25	40	120
Nakh R	Thailand	Resistant	92.9	87.7–99.2	0.25	40	120
NwOr S	S. America	Susceptible	11.9	11.2–12.6	0.001	—	—
Cayn R	S. America	Highly resistant	>500	—	0.75	30	180
StGe R	S. America	Highly resistant	>500	—	0.75	30	180

^aKDT₅₀: time (min) necessary to knock down 50% of individuals. KDT₅₀ was determined using papers impregnated with 0.05 g/100 mL deltamethrin following WHO insecticide testing recommendations.

^bDose of insecticide (g/100 mL) used for paper impregnation leading to 50% mortality after 1 h exposure.

^cR–/R+ segregation of resistant populations consisted in separating individuals dead at LT₂₅ from those surviving at LT₇₅ using impregnated paper corresponding to the LD₅₀.

allowed successful mapping of 68% of reads on *Ae. aegypti* genome. The majority of mapped reads consisted in perfect matches (46.6%), whereas reads matching with one and two or more mismatches represented 12.6% and 9.2% of sequenced reads, respectively. The mean coverage was homogenous across samples with a total mean coverage of 83× (Supplemental Fig. 1).

Gene amplifications linked to deltamethrin resistance

Of the 763 targeted candidate genes, 727 showed a mean coverage greater than 90 reads per kilobase per million reads (RPKM) and were considered for further analysis. Among them, 41 genes showed an increased coverage >1.5-fold in any resistant population compared to the mean coverage of all susceptible ones, together with an increased coverage >1.0-fold in LT₇₅ survivors (R+ phenotype) compared to individuals dead at LT₂₅ (R– phenotype). These genes were considered amplified in association with deltamethrin resistance (Supplemental Table 2). These genes mostly encoded detoxification enzymes with a significant enrichment in P450s (Fig. 1). Most gene amplifications occurred in gene clusters located within a few genomic supercontigs spread across all chromosomes (Fig. 2). Gene amplification profiles were highly

conserved within each region but showed marked differences between continents. Thai resistant populations (Nakh R and Phet R) showed a strong amplification of four CCEs located in supercontig 1.142 and another one in supercontig 1.1678. Two CYP6s located in supercontig 1.702 and two sulfotransferases in supercontig 1.975 were also amplified in Thai resistant populations. In contrast, resistant populations from South America (Cayn R and StGe R) showed a marked amplification of four CYP6s located in supercontig 1.1327. Resistant populations from both regions also shared the amplifications of several CYP9Js in supercontigs 1.1188 and 1.221. As expected, the less resistant laboratory population (Delta R) exhibited fewer gene amplifications associated with resistance. The amplification profile of the Delta R population shared particular gene amplifications with field resistant populations. This included a chloride channel also detected in Thailand together with two CYP4Js and a glycosyltransferase also detected in South America.

Validation of gene amplifications on individual mosquitoes

Nine gene amplifications identified by deep sequencing belonging to two P450 clusters and one CCE cluster heavily impacted by gene amplifications were cross-validated by qPCR on individual mosquitoes. The presence of gene amplifications was confirmed for all targeted genes. A good correlation was observed between CNVs obtained by deep sequencing and qPCR (Supplemental Fig. 2). Individual qPCR data reveal high copy number polymorphism within resistant populations (Supplemental Fig. 3). Estimating the frequency of gene amplifications within each population revealed that amplifications are frequent in resistant populations and sometimes also present at low frequencies in susceptible populations (Supplemental Fig. 4). Comparing the amplification profile of each gene across all individuals revealed CYP6 and CCE clusters are likely affected by single amplification events (Supplemental Fig. 5). In contrast, different copy numbers were frequently observed for genes belonging to the CYP9J

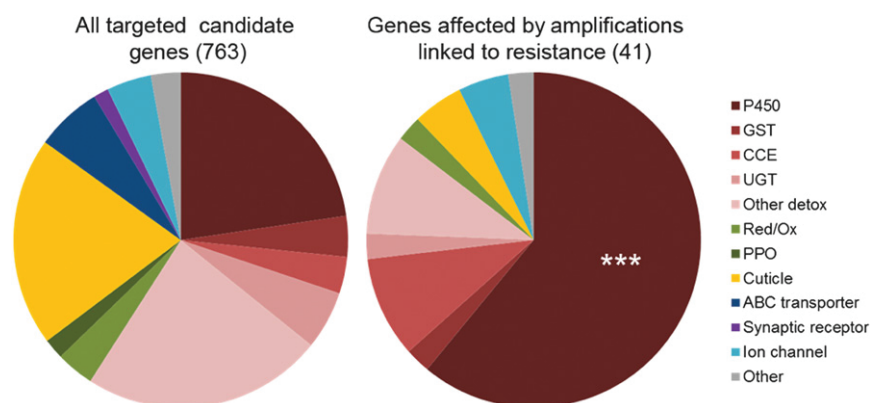


Figure 1. Gene families affected by gene amplifications associated with deltamethrin resistance. (Left) Frequency of each gene family among the 763 captured genes. (Right) Frequency of each gene family among the 41 genes affected by genic amplifications associated with deltamethrin resistance. Proportions of each gene family between all captured genes and genes affected by genic amplifications were compared using a one-sided Fisher's exact test: (***) $P < 0.001$.

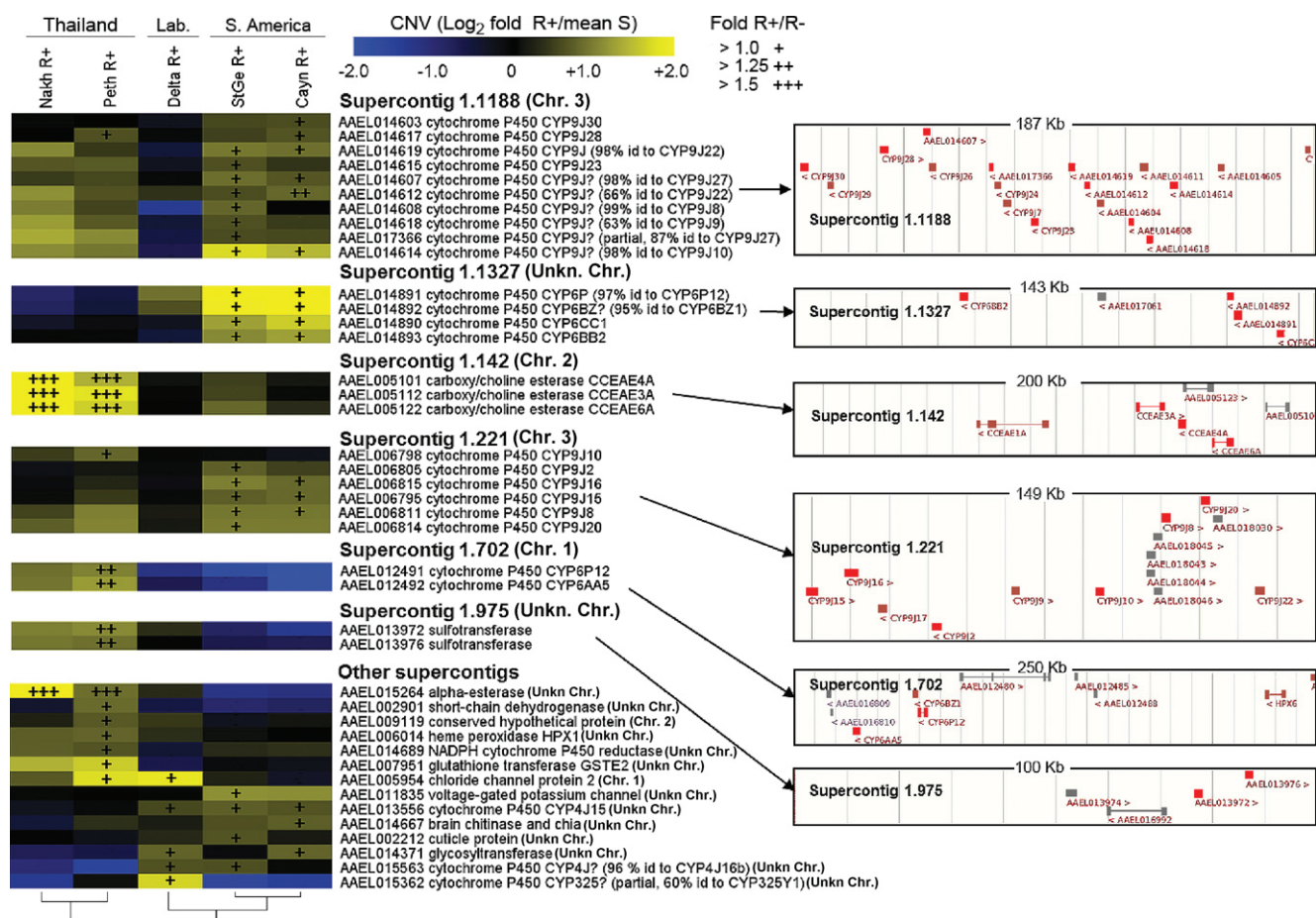


Figure 2. Gene amplifications associated with deltamethrin resistance. (Left) CNV profiles of genes affected by gene amplifications associated with deltamethrin resistance. Color scale shows (R+)/(meanS) CNV for each resistant population, and overimposed "+" marks show (R+)/(R-) CNV. (Right) Location of gene amplifications on genomic supercontigs. Amplified genes are shown in red. Nonamplified genes are shown in maroon. Genes not included in the capture design are shown in gray. Chromosomal locations are shown as described in Timoshevskiy et al. (2014) and Juneja et al. (2014).

cluster on supercontig 1.1188, suggesting that distinct duplication events affect this large P450 cluster.

Impact of gene amplifications on transcription levels

Comparing gene amplification levels obtained by DNA-sequencing with transcription levels obtained by RT-qPCR for the nine candidate genes across all resistant populations confirmed that gene amplifications are often associated with increased transcription (Supplemental Fig. 6). High and significant positive correlations were observed for most genes except for two *CYP9J*s in supercontig 1.1188, where positive correlations were not significant.

Association of gene amplifications with target-site mutations

Among the nine gene amplifications genotyped by qPCR, only one was found associated with *kdr* mutations (Supplemental Table 3). This association occurred in the Nakh population from Thailand, where a positive correlation between the presence of *CYP9J28* amplification and the presence of the V1016G mutation was found ($r = 0.61$; $P = 0.025$). As a consequence of the total segregation of V1016G and F1534C mutations in Thailand, the F1534C mutation was negatively correlated to *CYP9J28* amplification in this population ($r = -0.58$; $P = 0.036$).

Polymorphisms identified by deep targeted sequencing

A total of 41,469 polymorphisms supported by an important coverage were called against the reference genome. Among them, 30,400 were polymorphic among populations. A principal component analysis (PCA) based on allele frequency variation across all populations confirmed the overall population structure and the different genetic background of Thai, South-American, and laboratory (French Polynesia) populations (Supplemental Fig. 7). The reliability of polymorphism data was confirmed by comparing the frequencies of V1016I, V1016G, and F1534C *kdr* mutations estimated by deep targeted sequencing and those obtained by qPCR on individual mosquitoes (Supplemental Fig. 8). The presence of distinct *kdr* mutations at position 1016 in Thailand and South America was confirmed, and the F1534C mutation was also detected in most populations.

Polymorphisms associated with deltamethrin resistance

Searching for selection footprints using a Bayesian approach taking into account population structure (Foll et al. 2014) identified 156 outlier loci significantly associated with deltamethrin resistance. These outlier loci included 31 nonsynonymous variants and affected multiple supercontigs spread over all chromosomes.

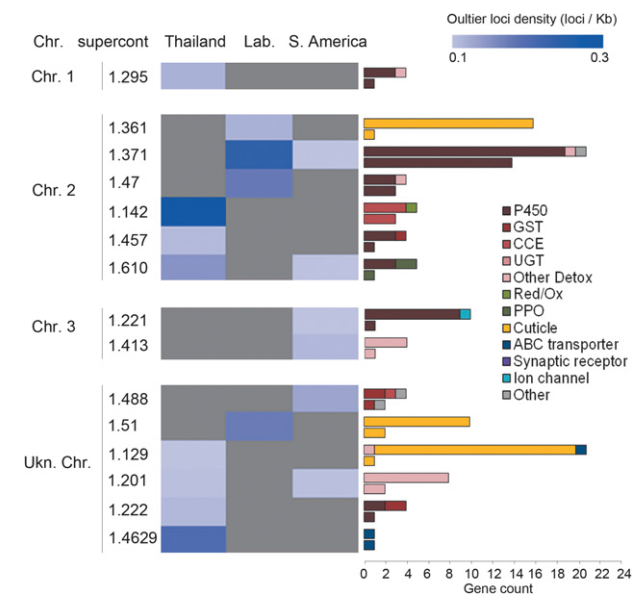


Figure 3. Supercontigs showing selection footprint. For each region, loci displaying a significant BayeScan3 F_{SC} Q -value <0.05 and both $f(R+)-f(S)$ and $f(R+)-f(R-)$ allele frequency variation occurring in the same direction were considered as outliers. For each supercontig, outlier loci densities were obtained by dividing the number of outlier loci by the total length of all captured genes (outlier loci per kb of captured region). Outlier loci densities are shown as a blue color scale. Gray stands for an absence of outlier loci. For each supercontig, horizontal bars show the number of captured genes from each gene family (upper bar) compared to those affected by outlier loci (lower bar). Supercontigs are clustered according to their putative chromosomal location as described in Timoshevskiy et al. (2014) and Juneja et al. (2014).

Selection footprints varied between geographical regions with outlier loci densities ranging from 0 to 4.1 per kb of captured sequence (Fig. 3). In Thailand, supercontigs 1.142 and 1.4629 showed high outlier loci densities with three CCE and one ABC transporter being affected. Six other supercontigs also displayed selection footprints impacting two P450s, two other detox enzymes, one PPO, and one cuticle protein. High outlier loci densities were identified in laboratory populations in supercontigs 1.371, 1.47, and 1.51 affecting 17 P450s and two cuticle proteins. Selection footprints were less pronounced in South America but showed overlap with laboratory and Thai populations.

Of the 30,400 polymorphic loci, 3054 loci showed an allele frequency variation between R+ phenotypes and their respective susceptible population $\geq 40\%$ together with an allele frequency variation between R+ and R- phenotypes $\geq 5\%$. These loci included 465 nonsynonymous variants (Supplemental Table 4). Comparing the Bayesian and the frequency filtering approaches revealed that the Bayesian approach was overall more stringent (Supplemental Fig. 9). However, the stringency of the Bayesian approach was high in South America, medium in Thailand, and low in laboratory populations following the decreasing diversity of these groups. The frequency filtering approach showed an opposite stringency with more variants identified in South America than Thailand and even less in laboratory populations. Frequency filtering identified 16 nonsynonymous variants shared by distinct geographic regions, whereas the Bayesian approach only identified variants being specific to each region.

Combining the best candidates identified by each approach identified 55 nonsynonymous variants strongly associated with

deltamethrin resistance (Fig. 4; Supplemental Table 4). These variants affected 39 distinct genes mainly belonging to P450s, UGTs, CCEs, and cuticle proteins. As for gene amplifications, allele frequency patterns were conserved within regions but often differed among continents. Most nonsynonymous variants affecting P450s were identified from South American or laboratory populations. These P450s mostly belong to CYP6, CYP9, and CYP12 families. Conversely, most variants affecting CCEs were identified from Thai populations. Two were both affected by gene amplifications and nonsynonymous variants with *CCEAE4A* bearing height distinct nonsynonymous variants associated with resistance. Several UGTs were also affected by nonsynonymous variants, with three showing an increased frequency across multiple regions. ABC transporters and cuticle proteins were most frequently affected in South America. Several other enzymes potentially involved in insecticide detoxification were also affected by nonsynonymous variants, including two aldehyde oxidases, one alcohol dehydrogenase, and one sulfotransferase. Finally, the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) AAEL004935 targeted by neonicotinoid insecticides and the voltage-gated sodium channel (VGSC) AAEL006019 targeted by pyrethroid insecticides were also affected. Variants detected in the VGSC corresponded to the S989P and F1534C *kdr* mutations previously described in this species. None of the V1016I/G *kdr* mutations previously associated with pyrethroid resistance was retained as best candidates. Neither of them was retained by the Bayesian approach, and the V1016G mutation only passed the allele frequency filtering in Thailand (Supplemental Table 4).

Discussion

Deep targeted sequencing for studying insecticide resistance

Screening for genomic changes associated with insecticide resistance remained challenging until the sequencing of mosquito genomes (Holt et al. 2002; Nene et al. 2007; Arensburger et al. 2010). Afterward, the development of mosquito DNA microarrays allowed screening for resistance genes based on their differential transcription, leading to the identification of detoxification genes conferring resistance (David et al. 2005, 2013; Strode et al. 2008; Vontas et al. 2010; Edi et al. 2014). However, these screenings focused on differential transcription while genomic changes such as CNVs and polymorphisms were neglected. Then, the development of high-throughput DNA sequencing allowed screening for genomic variants across whole genomes. However, such an approach required a huge amount of sequences to reach the minimum genome coverage necessary for accurately quantifying CNV and allele frequencies, making it unaffordable when several samples have to be compared. Although RNA-seq is more affordable and can generate gene expression and variant data concomitantly, this approach is not suitable for identifying CNVs and does not provide reliable polymorphism data from poorly expressed genes. In addition, allele frequencies inferred from RNA-seq are to be taken with caution because they can be altered by allele-specific expression events (Gaur et al. 2013).

Recently, the development of target enrichment techniques allowed conducting DNA-seq focused on genomic regions of interest, hence, drastically increasing the sequencing depth while maintaining costs at a reasonable level (Altmueller et al. 2014). By targeting more than 760 genes from all protein families potentially involved in insecticide resistance in the dengue mosquito,

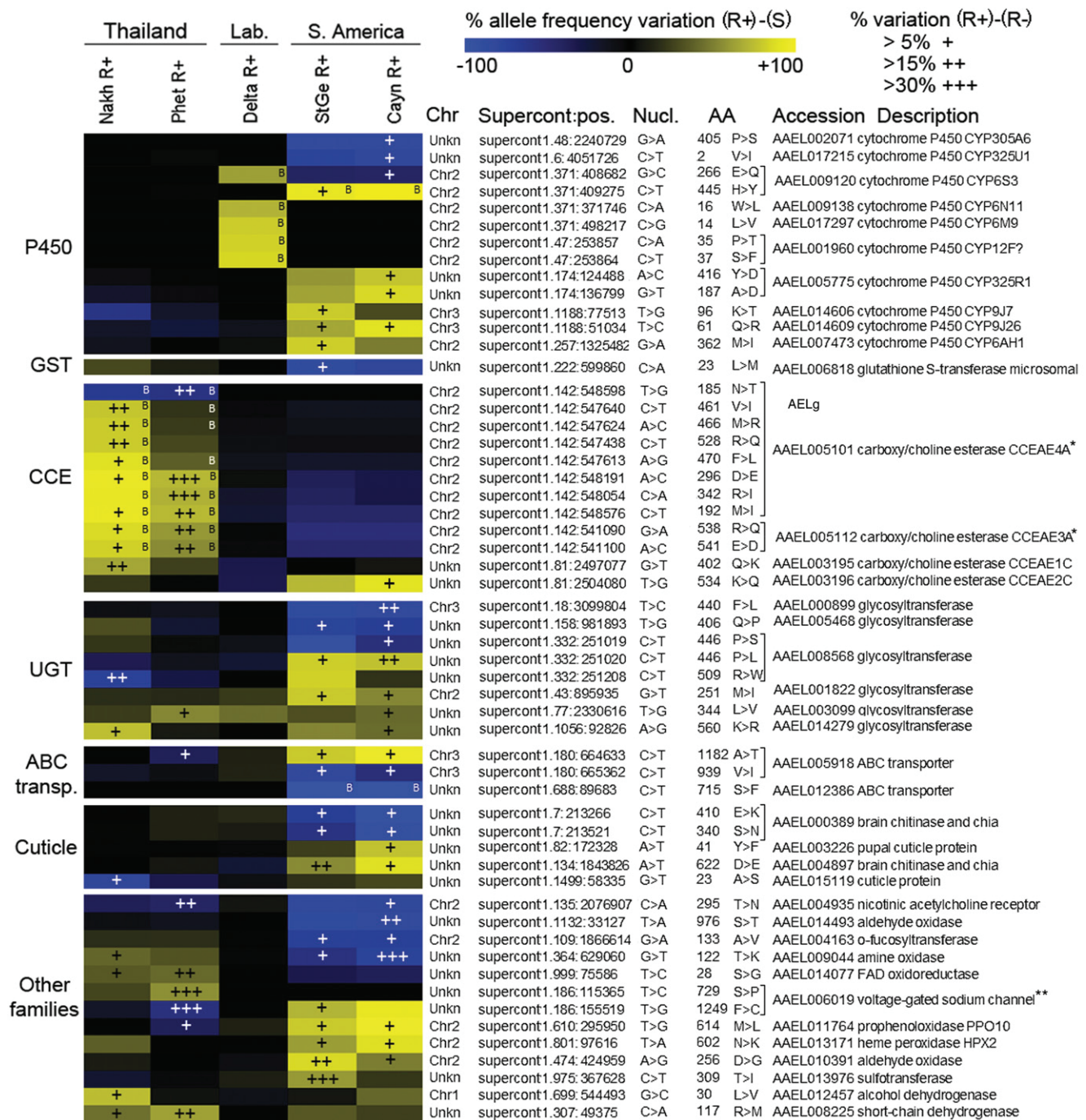


Figure 4. Best nonsynonymous polymorphisms associated with deltamethrin resistance. Only the 55 best differential nonsynonymous variants identified from frequency-based filtering and the Bayesian approach are shown (see Methods). For each region, allele frequency variation between each resistant population (R+ phenotypes) and their susceptible counterpart (S) are shown as a blue-yellow color scale. Blue indicates an enrichment in the reference allele, whereas yellow indicates an enrichment in the variant allele. Variants identified by the Bayesian approach are indicated by "B" marks. For variants passing frequency-based filtering or BayeScan3 filtering, allele frequency variation between R+ and R- phenotypes are shown as overimposed "+" marks. Variants are grouped by gene families and are described by the following annotations: chromosomal location (according to Juneja et al. 2014; Timoshevskiy et al. 2014), supercontig position, nucleotide change, amino acid change, gene accession number, and gene description. (*) Genes also found affected by CNVs linked to deltamethrin resistance. (**) The sodium channel S729P and F1249C variants correspond to the S989P and F1534C *kdr* mutations described in the literature due to changes in AEEL006019-RD transcript annotation.

our study screened for both CNVs and polymorphisms across several samples. Our experimental design allowed reaching a very deep coverage (>80x) across multiple resistant and susceptible

populations originating from different geographical areas, providing the first comprehensive screening of CNVs and polymorphisms associated with insecticide resistance. Targeted DNA-seq

data were consistent with qPCR data obtained from individual mosquitoes validating the robustness of the approach. Altogether, this study demonstrates that target enrichment coupled with high-throughput sequencing is a powerful tool for pinpointing genomic changes associated with adaptive traits from which candidate gene families are known.

Gene amplifications associated with pyrethroid resistance

Only a few CNVs were previously associated with insecticide resistance, and no comprehensive screening has ever been conducted in mosquitoes (for review, see Bass and Field 2011). The present study identified 41 genes affected by gene amplifications linked to deltamethrin resistance. Most were previously found significantly overtranscribed in pyrethroid resistant *Ae. aegypti* populations according to data publicly available in VectorBase expression browser (<https://vectorbase.org>, data sets from Strode et al. 2008; Marcombe et al. 2009; Poupardin et al. 2012; David et al. 2014). The majority of CNVs observed between resistant and susceptible populations were <2.5-fold, suggesting a predominance of duplications. However several genes displayed CNV >fivefold in particular resistant populations, suggesting that copy number may vary within continents. This was confirmed by qPCR on individual mosquitoes showing an important copy number polymorphism within and across resistant populations. Such polymorphism suggests that most amplifications are not fixed in resistant populations. The strong relationship between gene amplification and overtranscription was confirmed by RT-qPCR. Although, overexpression can also be triggered by *cis/trans* regulatory elements or post-translational events, the present study suggests that gene amplification is a common adaptive mechanism allowing mosquitoes to overexpress detoxification genes conferring resistance to insecticides. The importance of such mechanism may even be greater in species highly infected by transposable elements like *Ae. aegypti* because their presence is known to favor duplication events (Nene et al. 2007).

The present study revealed distinct gene amplification patterns among resistant populations according to their geographical origin. This supports that the selection of gene amplifications conferring resistance depends on the genetic background of populations, their population dynamics, and on the selection pressures they undergo. Most amplified genes encoded detoxification enzymes, suggesting that gene amplification is rather linked to metabolic resistance than resistance conferred by an altered transport/penetration of the insecticide.

The majority of detoxification enzymes affected by gene amplifications encoded P450s belonging to *CYP9J* and *CYP6* families that were frequently associated with insecticide resistance in mosquitoes (Vontas et al. 2012; David et al. 2013). The overrepresentation of P450s was expected because their overexpression is known to play a key role in pyrethroid resistance, and they are frequently affected by copy number variants (Feyereisen 2006, 2011). Several amplified *CYP9Js* were previously found overtranscribed in resistant populations and some of them (*CYP9J24*, *CYP9J28*, *CYP9J32*) have been validated as able to metabolize pyrethroids (Stevenson et al. 2012), supporting the importance of their amplification in resistance. Among the *CYP6s* amplified, most were previously found overtranscribed in resistant populations, and *CYP6BB2* was recently involved in pyrethroid metabolism (Kasai et al. 2014). In addition, some of their close orthologs in *Anopheles* (*CYP6P3*, *CYP6P7*, *CYP6P9*, *CYP6M2*, and *CYP6AA5*) are also capable of degrading pyrethroids (Boonsuepsakul et al. 2008; Müller

et al. 2008; Duangkaew et al. 2011; Stevenson et al. 2011; Riveron et al. 2013). Altogether, these results confirm the key role of P450 in the resistance of mosquitoes to pyrethroids and their propensity to increase their expression level through gene amplification when undergoing a strong selection pressure from insecticides.

Three CCEs (*CCEAE3A*, *CCEAE4A*, and *CCEAE6A*) belonging to a single genomic cluster were highly amplified in Thai resistant populations leading to their strong overtranscription. Highest amplification levels were found in the Nakh R population which is also resistant to organophosphates (Poupardin et al. 2014). In this previous study, the overtranscription of *CCEAE3A* and *CCEAE6A* through gene amplification was associated with temephos resistance at the larval stage, although resistance to pyrethroids was also observed. Other studies performed on South American and Caribbean populations confirmed the association of some of these CCEs with temephos resistance (Marcombe et al. 2009, 2012; Saavedra-Rodriguez et al. 2014). Our data revealed higher CCE copy number in mosquitoes surviving deltamethrin exposure (R+ phenotype), supporting their role in pyrethroid resistance. Although the association between pyrethroid resistance and these CCE genes in Thailand might be due to multiresistant individuals carrying both pyrethroid- and organophosphate-resistance genes, the role of CCEs in pyrethroid metabolism has been demonstrated in mammals (Hodgson 2003; Nakamura et al. 2007) and mosquitoes (Somwang et al. 2011; Chandor-Proust et al. 2013). However, no individual mosquito CCE has yet been validated as a pyrethroid metabolizer, and insecticide sequestration may also confer resistance. Further functional studies are required for validating the precise role of these amplified CCEs in pyrethroid resistance.

Two sulfotransferases were amplified in Thai resistant populations. The overtranscription of these enzymes has been frequently described in insecticide resistant mosquitoes and deserve further attention (Poupardin et al. 2012; Marcombe et al. 2013; Nkya et al. 2013). Indeed, their involvement in insecticide degradation pathways has been validated in mammals (Lee et al. 2007).

Among GSTs, only *GSTE2* was found amplified in Thai resistant populations. This GST is known for its ability to metabolize DDT in various mosquito species (Ortelli et al. 2003; Lumjuan et al. 2005), and recent studies confirmed its role in pyrethroid resistance although pyrethroid metabolism has not been observed (Lumjuan et al. 2011; Riveron et al. 2014b).

A recent study suggested that the duplication of the gene encoding the *Ae. aegypti* voltage-gated sodium channel (VGSC) targeted by pyrethroids contributed to resistance by maintaining together wild-type allele and *kdr* mutations and reducing mutant allele deleterious effects (Martins et al. 2013). A similar role was suggested for the duplication of the acetylcholinesterase gene (carrying the *Ace1* mutation) in the resistance of *An. gambiae* to carbamates (Edi et al. 2014). Although such a mechanism is likely contributing to resistance in mosquitoes, no amplification of genes encoding proteins targeted by insecticides were detected in our study. In addition, a poor association was observed between the presence of *kdr* mutations and gene amplifications affecting detoxification enzymes in individual mosquitoes. Indeed, recombination events are probably countering such association, especially as the VGSC gene and amplified detoxification genes are located on distant genomic regions. In addition, fitness costs associated with both *kdr* mutations and gene amplifications have been identified (Kondrashov 2012; Brito et al. 2013; Katju and Bergthorsson 2013; Rinkevich et al. 2013). Therefore, although *kdr* mutations and gene amplifications of detoxification enzymes

co-occur in resistant populations, additive fitness costs may contribute to segregate them at the individual level.

Polymorphisms associated with pyrethroid resistance

Apart from mutations affecting the proteins targeted by insecticides, very few nonsynonymous variants have been associated with insecticide resistance. In this context, the present study represents the first DNA-seq screening of variants associated with pyrethroid resistance in mosquitoes. Searching for selection footprints identified multiple genomic regions under selection, suggesting that pyrethroid resistance is polygenic. Several nonsynonymous variants were associated with deltamethrin resistance, but few were found in multiple geographic regions, confirming the strong influence of genetic background and population history on the selection of resistant alleles.

Although several nonsynonymous variants affecting P450s were identified from each region, those mostly associated with resistance were mainly detected in South American and laboratory populations. Some were previously identified in a permethrin-resistant strain by RNA-seq (David et al. 2014). In *Drosophila melanogaster*, functional studies demonstrated that nonsynonymous mutations in the P450 *CYP6A2* identified in the RDDT^R resistant strain have a prominent role in resistance by enhancing DDT metabolism (Amichot et al. 2004). In the mosquito, *Anopheles funestus*, directional selection footprints were found in the coding sequence of two *CYP6Ps* capable of metabolizing pyrethroids (Riverson et al. 2014a). Most nonsynonymous variants impacting CCEs were identified in Thailand with *CCEAE4A* and *CCEAE3A* impacted by multiple variants strongly associated with deltamethrin resistance. Elevated copy numbers of these genes were also identified in Thailand, suggesting that their amplification may have been followed by their neofunctionalization under insecticide selection pressure (Katju and Bergthorsson 2013). Interestingly, the best orthologous gene of *CCEAE4A* in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina* (LcαE7), encodes an esterase associated with organophosphate resistance through a single point mutation enhancing its activity toward these chemicals (Newcomb et al. 1997). Later, it was shown that another mutation of this gene allowed this enzyme to metabolize synthetic pyrethroids (Heidari et al. 2005; Devonshire et al. 2007). More recently, multiple randomly generated nonsynonymous mutations of this gene were shown to enhance its activity toward various pyrethroids including deltamethrin (Coppin et al. 2012). Although additional work is necessary for validating the role of these nonsynonymous variants, our data support the selection of detoxification enzyme variants as being a key process in the adaptation of mosquitoes to chemical insecticides.

Finally, multiple nonsynonymous variants were detected in the gene encoding the voltage-gated sodium channel targeted by pyrethroids (*kdr* mutations). Their frequencies were consistent with those previously reported in Thailand and South America (Stenhouse et al. 2013; Linss et al. 2014). However, neither of the two mutations extensively used as resistance markers (V1016I/G) were retained as best candidates. Although the V1016I mutation showed high frequencies in South American resistant populations, it showed a poor association with deltamethrin survival phenotype. The V1016G mutation was associated with resistance in one Thai population but was not retained among the best candidates according to our criteria. Instead, two other less-known mutations (S989P and F1534C) showed a stronger association with deltamethrin resistance. Such a result supports the

substantial contribution of other mechanisms in the resistance phenotype.

New tools for monitoring resistance genes in mosquito populations

Overall, the present study confirms that gene amplifications affecting detoxification enzymes are good markers of metabolic resistance in mosquitoes. Novel nonsynonymous variants potentially enhancing their ability to detoxify insecticides were also identified. Despite significant research efforts, developing molecular tests to track the overexpression of these enzymes in field populations has proved challenging in terms of affordability, throughput, and reliability; and current vector population monitoring tools do not include metabolic resistance markers (Bass et al. 2010). Detecting their increased copy number or the presence of specific variants conferring resistance through simple PCR-based DNA assays opens up new perspectives for managing insecticide resistance. Indeed, such novel resistance markers will be accessible to developing countries in terms of technology and affordability and will allow tracking down both target-site and metabolic-resistance alleles in individual mosquitoes and monitoring their frequencies through time and space among and within natural populations.

Methods

Mosquitoes

Nine *Ae. aegypti* populations of distinct genetic backgrounds were used. These included four populations susceptible to insecticides and five populations showing elevated resistance to deltamethrin. Two distant geographic areas where pyrethroid resistance is threatening mosquito control were studied: South East Asia (Thailand) and South America (French Guiana). Two resistant and one susceptible population having a close genetic background were studied in each area (see Table 2 for populations' information). In addition, one laboratory population selected with deltamethrin for five generations was used together in comparison to its susceptible "parental" population. The laboratory Liverpool population used for public genome sequencing (Liverpool population) (Nene et al. 2007) was used as an additional susceptible population. Resistant populations from Thailand and French Guiana were colonized for two generations in the laboratory without insecticide selection pressure before assessing resistance levels and sample collection.

Deltamethrin resistance levels

For each population, the exposure time necessary to knock down 50% of individuals (KDT₅₀) was determined on 2- to 4-d-old females using test tubes equipped with Whatman filter paper impregnated with 0.05% deltamethrin in silicone oil according to standard WHO procedure (WHO 2006). Then, a collection of Whatman filter papers impregnated with different concentrations of deltamethrin (from 0.005% to 0.75%) was used for evaluating the lethal dose for 50% of individuals (LD₅₀) of each population. Bioassays were conducted in duplicates of 40 2- to 4-d-old females, and mortality was recorded after 1 h exposure to deltamethrin and 24 h recovery without insecticide. For each resistant population, the impregnated paper killing 40%–60% mosquitoes after 1 h exposure was then used to segregate the most susceptible individuals (dead at LT₂₅: R- phenotype) from the most resistant ones

Variants associated with insecticide resistance

Table 2. Sample descriptions

Population	Group	Full name	Origin	History (year colonized)	Deltamethrin resistance
Livp S	Genome	Liverpool (genome)	West Africa	Laboratory colony (1930s)	Susceptible
Bora S	Laboratory	Bora-Bora	French Polynesia	Laboratory colony (1990s)	Susceptible
Delta R	Laboratory	Deltamethrin R	French Polynesia	Bora S selected	Slightly resistant
Patg S	Thailand	Patthalung	South Thailand	Laboratory colony (2013)	Susceptible
Phet R	Thailand	Phetchaburi	SW of Bangkok	Field collected	Resistant
Nakh R	Thailand	Nakhon Sawan	Center Thailand	Field collected	Resistant
NwOr S	S. America	New Orleans	Louisiana	Laboratory colony (1980s)	Susceptible
Cayn R	S. America	Cayenne	French Guiana	Field collected	Highly resistant
StGe R	S. America	St-Georges de l'Oyapock	French Guiana	Field collected	Highly resistant

(survivors at LT₇₅: R+ phenotype) by adjusting the exposure time from 10 min to 3 h.

Sample preparation

All sampled mosquitoes consisted of 2- to 4-d-old non-blood-fed *Ae. aegypti* females grown in standardized laboratory conditions. For each population/phenotype, 200 individuals were collected and stored individually in silica gel. For each population, three pools of 30 females not exposed to insecticide were also collected and stored in RNeasy (Life Technologies) for gene expression analyses. Gene amplification screening by exon capture and mass sequencing was performed on gDNA extracted from two pools of 65 individuals per population/phenotype. Genomic DNA was extracted using the PureGene Core Kit A (Qiagen) following the manufacturer's instructions. For each population/phenotype, gDNA from each pool were then combined in equal quantity in order to be representative of a total of 130 individuals. Quantitative PCR validation of gene amplifications and genotyping of *kdr* mutations was performed on gDNA extracted from 12 single adult females per population/phenotype using the method described in Collins et al. (1987) and resuspended in 20 µL nuclease-free water. Gene expression analyses were performed on RNA extracted from three pools of 30 adult females per population (R and S populations) using the RNeasy4PCR kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions and resuspended in 50 µL nuclease-free water.

Capture of target regions and sequencing

Gene capture was performed by Hybrigenics-Helixio (Clermont-Ferrand, France) using the SureSelect target enrichment system (Agilent). Capture library consisted in 51,073 overlapping RNA probes of 120 bp (baits) targeting 3458 exons belonging to 789 genes. The mean coverage of target regions was 4×. These genes were chosen according to their putative role in insecticide resistance. These genes include all detoxification enzymes *sensu lato*, all cuticle proteins, all ABC transporters together with several ion channels, redox enzymes, and synaptic proteins (list of captured genes in Supplemental Table 5). Capture of target genes was performed according to "SureSelect Target Enrichment System for Illumina Paired-end Sequencing Library version 1.5" protocol. Briefly, 3 µg gDNA were fragmented using a Bioruptor (Diagenode), ligated to adaptors, and amplified by PCR using Herculase II DNA polymerase (Agilent). After QC analysis, libraries were hybridized to biotinylated baits and purified using Dynabeads MyOne Streptavidin T1 beads (Life Technologies). Captured DNA fragments were amplified, purified, and multiplexed before sequencing. Paired-end sequencing was performed on a Ge-

nome Analyzer IIx (Illumina) producing 76 bp reads. An average sequencing coverage of greater than 60× was expected for each sample.

Reads filtering and mapping

Sequenced reads were assigned to each sample (unplexing), and adaptors were removed. Overall read quality was checked for each sample using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Reads were then filtered based on their length, pairing, and quality using Trimmomatic (Bolger et al. 2014). Parameters were set as follows: read length ≥76 bp; mean Phred quality score greater than 30; and Phred quality score greater than 30 across all read (10-bp sliding window). Only paired reads were kept for mapping. Reads were mapped to *Ae. Aegypti* genome (AaegL2 assembly) using BWA (Li and Durbin 2009) with default parameters implemented into a Galaxy pipeline (<http://galaxyproject.org>). Mapped reads were loaded into Genespring NGS version 12.5 (Agilent) and further filtered according to their mapping quality (alignment score of 95 or above). In case of multiple mapped reads, only primary hits were conserved.

Copy number variation analysis

Coverage of target genes was quantified for each sample and normalized according to the total number of filtered reads per library. Only genes showing more than 90 reads per kilobase exon model per million sequenced reads (RPKM) in all samples were considered for further analysis. Detection of copy number variation (CNV) was based on differential coverage between samples obtained from resistant and susceptible populations. Fold changes (FC) between resistant samples (R+ and R- phenotypes) and all susceptible populations (meanS) were computed for each gene. Genes satisfying the following criteria in any resistant population were considered affected by gene amplifications in association with deltamethrin resistance: [(R+)/(meanS) FC ≥ 1.5] and [(R+)/(R-) FC] > 1 (i.e., 1.5-fold more copies in resistant samples and more copies in LD₇₅ survivors compared to LD₂₅ dead).

Validation of gene amplifications on individual mosquitoes

Gene amplifications detected by previous CNV analysis were further studied by qPCR on 156 individual mosquitoes (12 from each population/phenotype). Nine candidate genes located in three different genomic clusters affected by gene amplifications were selected: Supercontig 1.1188: AEEL014614 (*CYP9J7*), AEEL014615 (*CYP9J23*), and AEEL014617 (*CYP9J28*); Supercontig 1.1327: AEEL014890 (*CYP6CC1*), AEEL014891 (*CYP6P7*), and AEEL014893 (*CYP6BB2*); Supercontig 1.142: AEEL05112 (*CCEAE3A*), AEEL005101 (*CCEAE4A*), and AEEL005122

(CCEAE6A). PCR primers targeting exonic regions were designed using NCBI Primer BLAST and checked for specificity against the whole *Ae. aegypti* genome (Supplemental Table 6). Two target genes showing a constant copy number across all samples from sequencing data (see above) were used for normalization (AAEL005950 and AAEL007808). Real-time quantitative PCR was performed on an iQ5 cycler (Bio-Rad). PCR reactions consisted of 3 μ L gDNA template (see above), 3.6 μ L nuclease free water, 0.45 μ L of each primer (10 mM), and 7.5 μ L of SYBR Green Supermix 2 \times (Bio-Rad). A dilution scale made from a pool of all gDNA samples was used for assessing PCR efficiency and quantification. All samples were amplified in triplicates (14 populations \times 12 individuals \times 3 replicates). After normalization, CNVs were expressed as mean relative gDNA quantity compared to one individual of the Livp S population.

Impact of gene amplifications on transcription levels

The link between gene amplifications and increased transcription levels was investigated on nine genes (see above) by RT-qPCR. Total RNA samples from each population were treated with DNase I (Invitrogen) to remove genomic DNA following the manufacturer's instructions. Reverse transcription and qPCR reactions were performed as described in Nkya et al. (2014). Data analysis was performed according to the $\Delta\Delta C_t$ method taking into account PCR efficiency (Pfaffl 2001) and using the housekeeping genes encoding the ribosomal proteins L8 (AGAP005802) and S7 (AGAP010592) for normalization. Three technical replicates were performed per population, and results were expressed as mean transcription ratio in each resistant population \pm SD relative to the mean transcription ratio of all susceptible populations.

Polymorphism calling and population structure

Polymorphisms (SNPs, multiple nucleotide polymorphisms [MNPs], and indels) were called against the reference genome using filtered reads by using Genespring NGS version 12.5 (Agilent). Calling parameters were as follows for each sample: calling score of 50 or above (P -value $< 10^{-5}$); ignore homopolymer 10 or higher and surrounding positions; locus coverage of 30 or more. Variants identified from each sample were further filtered based on their coverage and strand bias across all samples (coverage 30 or more; strand bias 140 or less). For each variant, allele frequencies were estimated for each population based on the number of reads supporting each allele, and genic effects were computed against the reference genome. A principal component analysis (PCA) based on allele frequencies of all polymorphic variants across all samples was used for inferring the genetic structure of the studied populations and confirming the relevance of the geographical groups.

Searching for selection footprint using a hierarchical Bayesian approach

BayeScan3 was used for identifying loci under natural selection through a hierarchical Bayesian model, taking into account population structure and usable on pools of individuals (Foll et al. 2014). This approach estimates the probability that each locus is subject to selection by discriminating population-specific and locus-specific components of the fixation index using a logistic regression. The posterior probability of a given locus being under selection is assessed by defining two alternative models, one including the locus-specific effect and the other excluding it.

Departure from neutrality is supposed when the locus-specific component is necessary to explain the observed pattern of diversity using a reversible jump Markov chain Monte Carlo (MCMC). Because the high genetic proximity between R+ and R- phenotypes can bias the estimation of the neutral model, only S populations and R+ phenotypes from resistant populations were used. For the same reasons, loci showing allele frequency $< 5\%$ or $> 95\%$ in all samples were not considered. BayeScan3 was run with default parameters and the following hierarchical structure: Thailand (Patg S, Nakh R+, and Phet R+), South America (NwOr S, Cayn R+, StGe R+), and Laboratory (Bora S, Delta R+). Loci showing a F_{sc} Q-value ≤ 0.05 in any geographical group were considered under selection (i.e., outlier locus). These loci were further filtered based on their association with the resistance phenotype by retaining only those showing both $[f(R+)-f(S)]$ and $[f(R+)-f(R-)]$ metrics being positive (enrichment of variant allele) or negative (enrichment of reference allele). Because *Ae. aegypti* genome is not assembled, selection footprints were looked for at the supercontigs scale. For each supercontig, the density of outlier loci was computed by dividing the number of outlier loci by the total length of captured regions within the supercontig. In order to avoid inferring selection footprint from limited genomic coverage, only supercontigs represented by not more than four genes or from which the captured region represented $> 10\%$ of supercontig length were considered.

Identifying polymorphisms mostly associated with deltamethrin resistance

Allele frequency-based filtering was combined with the Bayesian approach for identifying polymorphisms most strongly associated with deltamethrin resistance. Frequency-based filtering consisted in retaining alleles satisfying the following conditions in any resistant/susceptible population pair from each geographical group: $[f(R+)-f(S) \geq 40\%]$ and $[f(R+)-f(R-) \geq 5\%]$ and both metrics being positive or negative. Alleles passing both the frequency-based filtering and the Bayesian approach were retained. In addition, the best candidates obtained by each approach were also retained. For the Bayesian approach, this included loci showing F_{sc} Q-values within the best 10th percentile from each region. For frequency-based filtering, this includes alleles passing frequency-based filtering and showing the five highest $Abs([f(R+)-f(S)]+[f(R+)-f(R-)])$ metric from each region. Variants most associated with deltamethrin resistance were then filtered according to their genic effects and those being nonsynonymous (i.e., affecting protein sequence) were retained.

Validation of polymorphism data and association between *kdr* mutations and gene amplifications

Allele frequencies obtained by high-throughput sequencing were validated on *kdr* mutations (V1016I, V1016G, and F1534C) on 156 individuals (12 individual mosquitoes from each population/phenotype). Genomic DNA was extracted as described above, and *kdr* mutations were detected by qPCR following the method described in Saavedra-Rodriguez et al. (2007). Associations between the presence of *kdr* mutations and gene amplifications were tested across the five resistance populations for the three *kdr* mutations and the nine genotyped gene amplifications by testing linear correlations between the *kdr* genotype (0: homozygote wildtype, 0.5: heterozygote, 1: homozygote resistant) and gene amplification levels.

Data access

The sequence data from this study have been submitted to the European Nucleotide Archive (ENA; <http://www.ebi.ac.uk/ena>) under accession number PRJEB7976.

Acknowledgments

This project was primarily funded by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, INEE department) (Grant programme APEGE 2013, project Mosqui-Target). Additional funding was received from the French Institut de Microbiologie et Maladies Infectieuses (grant IMMI 109764). We also thank the Laboratoire d'Ecologie Alpine of Grenoble for additional funding. F.F. was supported by a PhD fellowship from the Grenoble-Alpes University. We acknowledge support from the federative structure Environmental and Systems Biology (BEeSy) of Grenoble-Alpes University. This work was also supported by the French-Thai cooperation programme-PHC Siam project (RESA 2013–2014) funded by the French embassy and the Office of the Higher Education Commission of Thailand. We also thank the Thailand International Development Cooperation Agency (TICA) through the STOP-VEC programme. This work was also supported by the Center for Advanced Studies for Agriculture and Food, Institute for Advanced Studies, Kasetsart University under the Higher Education Research Promotion and National Research University Project of Thailand, Office of the Higher Education Commission, Ministry of Education, Thailand. W.J. was supported by the Thailand Research Fund (senior research scholarship RTA 5558002 and grant for new researchers MRG 5380102) and Kasetsart University Research and Development Institute (KURDI). We also acknowledge the UMR 5558 and the Pôle Rhône-Alpin de Bioinformatique (PRABI) for providing access to their computational cluster. Finally, we thank Dr. A. Bonin, Dr. M. Weill, and the anonymous reviewers for their constructive comments on the manuscript.

Author contributions: F.F. was involved in all aspects of the study and helped draft the manuscript. I.D. contributed to field sampling and molecular analyses. T.G. provided technical support for mosquito rearing and contributed to sample preparation. V.N. and F.B. contributed to data analyses and helped draft the manuscript. F.C., W.J., T.C., R.G., I.D., and V.C. contributed to study design and helped draft the manuscript. P.S., K.T., and R.P. contributed to field sampling. S.R. contributed to sample preparation and helped analyze data and draft the manuscript. J.P.D. conceived the study, contributed to field sampling and sample preparation, analyzed data, and wrote the manuscript.

References

- Altmüller J, Budde BS, Nüernberg P. 2014. Enrichment of target sequences for next-generation sequencing applications in research and diagnostics. *Biol Chem* **395**: 231–237.
- Amichot M, Tarés S, Brun-Barale A, Arthaud L, Bride JM, Bergè JB. 2004. Point mutations associated with insecticide resistance in the *Drosophila* cytochrome P450 *Cyp6a2* enable DDT metabolism. *Eur J Biochem* **1**: 1250–1257.
- Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, Bartholomay L, Bidwell S, Caler E, Camara F, et al. 2010. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* establishes a platform for mosquito comparative genomics. *Science* **330**: 86–88.
- Bariami V, Jones CM, Poupardin R, Vontas J, Ranson H. 2012. Gene amplification, ABC transporters and cytochrome P450s: unraveling the molecular basis of pyrethroid resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1692.
- Bass C, Field LM. 2011. Gene amplification and insecticide resistance. *Pest Manag Sci* **67**: 886–890.
- Bass C, Nikou D, Vontas J, Donnelly MJ, Williamson MS, Field LM. 2010. The Vector Population Monitoring Tool (VPMT): high-throughput DNA-based diagnostics for the monitoring of mosquito vector populations. *Malar Res Treat* **2010**: 190434.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**: 504–507.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120.
- Boonsuepsakul S, Luepromchai E, Rongnoparut P. 2008. Characterization of *Anopheles minimus* CYP6AA3 expressed in a recombinant baculovirus system. *Arch Insect Biochem Physiol* **69**: 13–21.
- Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* **17**: 87–94.
- Brito LP, Linss JG, Lima-Camara TN, Belinato TA, Peixoto AA, Lima JB, Valle D, Martins AJ. 2013. Assessing the effects of *Aedes aegypti* *kdr* mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. *PLoS One* **8**: e60878.
- Chandor-Proust A, Bibby J, Regent-Kloekner M, Roux J, Guittard-Crilat E, Poupardin R, Riaz MA, Paine M, Dauphin-Villemant C, Reynaud S, et al. 2013. The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochem J* **455**: 75–85.
- Collins FS, Drumm ML, Cole JL, Lockwood WK, Vandewoude GF, Iannuzzi MC. 1987. Construction of a general human-chromosome jumping library, with application to cystic-fibrosis. *Science* **235**: 1046–1049.
- Coppin CW, Jackson CJ, Sutherland T, Hart PJ, Devonshire AL, Russell RJ, Oakeshott JG. 2012. Testing the evolvability of an insect carboxylesterase for the detoxification of synthetic pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **42**: 343–352.
- Corbel V, Nosten F, Thanispong K, Luxemburger C, Kongmee M, Chareonviriyaphap T. 2013. Challenges and prospects for dengue and malaria control in Thailand, Southeast Asia. *Trends Parasitol* **29**: 623–633.
- David JP, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H. 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 4080–4084.
- David JP, Ismail HM, Chandor-Proust A, Paine MJ. 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 20120429.
- David JP, Faucon F, Chandor-Proust A, Poupardin R, Riaz MA, Bonin A, Navratil V, Reynaud S. 2014. Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics* **15**: 174.
- Devonshire AL, Heidari R, Huang HZ, Hammock BD, Russell RJ, Oakeshott JG. 2007. Hydrolysis of individual isomers of fluorogenic pyrethroid analogs by mutant carboxylesterases from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **37**: 891–902.
- Duangkaew P, Pethuan S, Kaewpa D, Boonsuepsakul S, Saraputit S, Rongnoparut P. 2011. Characterization of mosquito CYP6P7 and CYP6AA3: differences in substrate preference and kinetic properties. *Arch Insect Biochem Physiol* **76**: 236–248.
- Edi CV, Djogbénou L, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch MA, Poupardin R, Jones CM, Essandoh J, Kétoh GK, Paine MJ, et al. 2014. CYP6 P450 enzymes and *ACE-1* duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *PLoS Genet* **10**: e1004236.
- Feyereisen R. 2006. Evolution of insect P450. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 6): 1252–1255.
- Feyereisen R. 2011. Arthropod CYPomes illustrate the tempo and mode in P450 evolution. *Biochim Biophys Acta* **1814**: 19–28.
- Foll M, Gaggiotti OE, Daub JT, Vatsiou A, Excoffier L. 2014. Widespread signals of convergent adaptation to high altitude in Asia and America. *Am J Hum Genet* **95**: 394–407.
- Gaur U, Li K, Mei S, Liu G. 2013. Research progress in allele-specific expression and its regulatory mechanisms. *J Appl Genet* **54**: 271–283.
- Harris AF, McKemey AR, Nimmo D, Curtis Z, Black I, Morgan SA, Oviedo MN, Lacroix R, Naish N, Morrison NI, et al. 2012. Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol* **30**: 828–830.
- Heidari R, Devonshire AL, Campbell BE, Dorrian SJ, Oakeshott JG, Russell RJ. 2005. Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by in vitro mutagenesis. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 597–609.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 653–665.

- Hodgson E. 2003. In vitro human phase I metabolism of xenobiotics I: pesticides and related compounds used in agriculture and public health, May 2003. *J Biochem Mol Toxicol* **17**: 201–206.
- Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, et al. 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* **476**: 454–457.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R, et al. 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**: 129–149.
- Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Okamura Y, Masada M, Tomita T. 2010. Genomic structures of *Cyp9m10* in pyrethroid resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol* **40**: 631–640.
- Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Masada M, Tomita T. 2011. Cis-acting mutation and duplication: history of molecular evolution in a P450 haplotype responsible for insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol* **41**: 503–512.
- Juneja P, Osei-Poku J, Ho YS, Ariani CV, Palmer WJ, Pain A, Jiggins FM. 2014. Assembly of the genome of the disease vector *Aedes aegypti* onto a genetic linkage map allows mapping of genes affecting disease transmission. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: e2652.
- Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, Tomita T. 2014. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: e2948.
- Katju V, Bergthorsson U. 2013. Copy-number changes in evolution: rates, fitness effects and adaptive significance. *Front Genet* **4**: 273.
- Kondrashov FA. 2012. Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. *Proc Biol Sci* **279**: 5048–5057.
- Lacey LA. 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* **23**(2 Suppl): 133–163.
- Lee CH, Kamijima M, Li C, Taneda S, Suzuki AK, Nakajima T. 2007. 3-Methyl-4-nitrophenol metabolism by uridine diphosphate glucuronosyltransferase and sulfotransferase in liver microsomes of mice, rats, and Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Environ Toxicol Chem* **26**: 1873–1878.
- Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **25**: 1754–1760.
- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR. 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* **52**: 231–253.
- Linss JG, Brito LP, Garcia GA, Araki AS, Bruno RV, Lima JB, Valle D, Martins AJ. 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys *Kdr* mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit Vectors* **7**: 25.
- Lounibos LP. 2002. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* **47**: 233–266.
- Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, Hemingway J, Ranson H. 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 861–871.
- Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara LA, Somboon P, Lycett G, Ranson H. 2011. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **41**: 203–209.
- Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yébakima A, Ranson H, Corbel V, et al. 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* **10**: 494.
- Marcombe S, Mathieu RB, Pocquet N, Riaz MA, Poupardin R, Sélior S, Darriet F, Reynaud S, Yébakima A, Corbel V, et al. 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS One* **7**: e30989.
- Marcombe S, Paris M, Paupy C, Binguier C, Yébakima A, Chandre F, David JP, Corbel V, Despres L. 2013. Insecticide-driven patterns of genetic variation in the dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique Island. *PLoS One* **8**: e77857.
- Martins AJ, Brito LP, Linss JG, Rivas GB, Machado R, Bruno RV, Lima JB, Valle D, Peixoto AA. 2013. Evidence for gene duplication in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*. *Evol Med Public Health* **2013**: 148–160.
- Müller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J, et al. 2008. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* **4**: e1000286.
- Nakamura Y, Sugihara K, Sone T, Isobe M, Ohta S, Kitamura S. 2007. The *in vitro* metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology* **235**: 176–184.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi ZY, Megy K, Grabherr M, et al. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* **316**: 1718–1723.
- Newcomb RD, Campbell PM, Ollis DL, Cheah E, Russell RJ, Oakeshott JG. 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 7464–7468.
- Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David JP. 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol* **43**: 407–416.
- Nkya T, Akhouayri I, Poupardin R, Batengana B, Mosha F, Magesa S, Kisinza W, David JP. 2014. Insecticide resistance mechanisms associated with different environments in the malaria vector *Anopheles gambiae*: a case study in Tanzania. *Malar J* **13**: 1–15.
- Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J* **373**(Pt 3): 957–963.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* **29**: 6.
- Poupardin R, Riaz MA, Jones CM, Chandor-Proust A, Reynaud S, David JP. 2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquat Toxicol* **114–115**: 49–57.
- Poupardin R, Srisukontarat W, Yunta C, Ranson H. 2014. Identification of carboxylesterase genes implicated in temephos resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: e2743.
- Ranson H, Burhani J, Lumjuan N, Black WC. 2010. Insecticide resistance in dengue vectors. *TropIKA.net* **1**: 1–12.
- Rinkevich FD, Du Y, Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* **106**: 93–100.
- Riveron JM, Irving H, Ndula M, Barnes KG, Ibrahim SS, Paine MJ, Wondji CS. 2013. Directionally selected cytochrome P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 252–257.
- Riveron JM, Ibrahim SS, Chanda E, Mzilahowa T, Cuamba N, Irving H, Barnes KG, Ndula M, Wondji CS. 2014a. The highly polymorphic CYP6M7 cytochrome P450 gene partners with the directionally selected CYP6P9a and CYP6P9b genes to expand the pyrethroid resistance front in the malaria vector *Anopheles funestus* in Africa. *BMC Genomics* **15**: 817.
- Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, Djouaka R, Irving H, Menze BD, Ismail HM, Hemingway J, Ranson H, Albert A, et al. 2014b. A single mutation in the *GSTE2* gene allows tracking of metabolically based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol* **15**: R27.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores AE, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, et al. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **16**: 785–798.
- Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Flores AE, Garcia-Luna S, Reyes-Solis G, Ranson H, Hemingway J, Black WC IV. 2014. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes after temephos selection. *Insect Mol Biol* **23**: 199–215.
- Scholte EJ, Knols BG, Samson RA, Takken W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J Insect Sci* **4**: 19.
- Somwang P, Yanola J, Suwan W, Walton C, Lumjuan N, Prapanthadara LA, Somboon P. 2011. Enzymes-based resistant mechanism in pyrethroid resistant and susceptible *Aedes aegypti* strains from northern Thailand. *Parasitol Res* **109**: 531–537.
- Stenhouse SA, Plernsub S, Yanola J, Lumjuan N, Dantrakool A, Choochoote W, Somboon P. 2013. Detection of the V1016G mutation in the voltage-gated sodium channel gene of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) by allele-specific PCR assay, and its distribution and effect on deltamethrin resistance in Thailand. *Parasit Vectors* **6**: 253.
- Stevenson BJ, Bibby J, Pignatelli P, Muangnoicharoen S, O'Neill PM, Lian LY, Muller P, Nikou D, Steven A, Hemingway J, et al. 2011. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochem Mol Biol* **41**: 492–502.
- Stevenson BJ, Pignatelli P, Nikou D, Paine MJ. 2012. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1595.
- Strode C, Wondji CS, David JP, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne SH, Hemingway J, Black WC IV, et al. 2008.

- Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 113–123.
- Timoshevskiy VA, Kinney NA, deBruyn BS, Mao C, Tu Z, Severson DW, Sharakhov IV, Sharakhova MV. 2014. Genomic composition and evolution of *Aedes aegypti* chromosomes revealed by the analysis of physically mapped supercontigs. *BMC Biol* **12**: 27.
- Vontas J, Ranson H, Alphey L. 2010. Transcriptomics and disease vector control. *BMC Biol* **8**: 52.
- Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, Torre AD, Ranson H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol* **104**: 126–131.
- Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, et al. 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* **476**: 450–453.
- WHO. 2006. *Guidelines for testing mosquito adulticides for indoor residual spraying and treatment of mosquito nets*. Document WHO/CDS/NTD/WHOPES/GCDPP/3. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO. 2009. *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. World Health Organization Factsheet no117 revised March 2009. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO. 2014. *Chikungunya*. World Health Organization Fact Sheet N° 327. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wondji CS, Irving H, Morgan J, Lobo NF, Collins FH, Hunt RH, Coetzee M, Hemingway J, Ranson H. 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res* **19**: 452–459.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Somwang P, Prapanthadara LA. 2011. High-throughput assays for detection of the F1534C mutation in the voltage-gated sodium channel gene in permethrin-resistant *Aedes aegypti* and the distribution of this mutation throughout Thailand. *Trop Med Int Health* **16**: 501–509.

Received January 5, 2015; accepted in revised form June 30, 2015.



Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing

Frederic Faucon, Isabelle Dusfour, Thierry Gaudé, et al.

Genome Res. published online July 23, 2015

Access the most recent version at doi:[10.1101/gr.189225.115](https://doi.org/10.1101/gr.189225.115)

Supplemental Material <http://genome.cshlp.org/content/suppl/2015/07/13/gr.189225.115.DC1.html>

P<P Published online July 23, 2015 in advance of the print journal.

Open Access Freely available online through the *Genome Research* Open Access option.

Creative Commons License This article, published in *Genome Research*, is available under a Creative Commons License (Attribution-NonCommercial 4.0 International), as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>.

Email Alerting Service Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article or [click here](#).



**All Modifications and
Oligo Types Synthesized**
Long Oligos • Fluorescent • Chimeric • DNA • RNA • Antisense

Oligo Modifications?
Your wish is our command.



To subscribe to *Genome Research* go to:
<http://genome.cshlp.org/subscriptions>

Supplementary Tables

Suppl Table 1. Sequencing statistics.

Sample	Sequenced reads (x10 ⁶) (%)		Filtered (x10 ⁶) ^a (%)		Perfect match (x10 ⁶) (%)		1 mismatch (x10 ⁶) (%)		≥ 2 mismatches (x10 ⁶) (%)	
Livp S	4.32	100	2.95	68.4	2.04	47.3	0.53	12.3	0.38	8.8
Bora S	4.01	100	2.67	66.6	1.64	40.8	0.58	14.6	0.45	11.2
Delta R-	4.05	100	2.69	66.5	1.64	40.6	0.59	14.6	0.46	11.3
Delta R+	4.26	100	2.87	67.2	1.77	41.5	0.62	14.5	0.48	11.2
Patg S	4.51	100	3.08	68.3	2.20	48.8	0.51	11.4	0.36	8.0
Phet R-	4.46	100	3.10	69.5	2.25	50.4	0.51	11.3	0.35	7.8
Phet R+	4.48	100	3.14	70.1	2.27	50.7	0.51	11.5	0.35	7.9
Nakh R-	4.59	100	3.18	69.5	2.28	49.8	0.54	11.7	0.37	8.0
Nakh R+	3.37	100	2.36	70.0	1.69	50.1	0.40	11.9	0.27	8.0
NwOr S	4.18	100	2.88	69.0	2.00	47.8	0.52	12.4	0.37	8.7
Cayn R-	3.88	100	2.64	67.9	1.78	45.8	0.50	12.9	0.36	9.3
Cayn R+	4.10	100	2.82	69.0	1.90	46.4	0.53	13.0	0.39	9.5
StGe R-	6.39	100	4.29	67.2	2.91	45.5	0.80	12.5	0.58	9.1
StGe R+	4.37	100	2.98	68.2	2.02	46.2	0.55	12.7	0.41	9.3
Mean	4.35	100	2.98	68.4	2.03	46.6	0.55	12.7	0.40	9.2

^a: Reads passing all filtering steps (read pairing, sequence quality and mapping quality)

Supplementary Table 2. Gene amplifications linked to deltamethrin resistance.

Supplementary Table 2. Genes affected by gene amplifications associated with deltamethrin resistance

Gene ID	Supercontig	Chromosome	Description ^a	FC versus all susceptible strains ^b										FC (R+ / R-) ^c				
				Delta		Phet		Nakh		Cayn		StGe		Delta	Phet R	Nakh	Cayn	StGe
				R-	R+	R-	R+	R-	R+	R-	R+	R-	R+	R	R	R	R	R
AAEL002212	supercont1.51	Unk_Ch	cuticle protein	1,57	1,24	1,01	-1,17	-1,05	-1,00	1,24	1,12	1,53	1,58	0,79	-1,16	0,04	0,90	1,03
AAEL002901	supercont1.71	Unk_Ch	short-chain dehydrogenase	-1,21	-1,48	1,71	1,79	-1,48	-1,33	-1,54	-1,74	-1,78	-1,91	1,22	1,05	0,15	1,13	1,07
AAEL005101	supercont1.142	chr2	carboxy/choline esterase CCEAE4A	-1,06	1,07	1,31	2,63	6,44	11,49	1,06	1,09	1,43	1,41	-1,00	2,01	5,04	1,03	0,99
AAEL005112	supercont1.142	chr2	carboxy/choline esterase CCEAE3A	-1,11	1,03	1,46	3,51	8,64	15,23	1,02	1,04	1,32	1,45	-0,92	2,41	6,59	1,02	1,10
AAEL005122	supercont1.142	chr2	carboxy/choline esterase CCEAE6A	-1,01	-1,01	1,41	3,11	8,70	15,11	1,28	1,25	1,80	1,76	1,00	2,20	6,41	0,98	0,98
AAEL005954	supercont1.181	chr1	chloride channel protein 2	3,34	3,70	3,28	3,38	1,97	1,62	-1,09	-1,27	1,27	1,20	1,11	1,03	-0,34	1,16	0,94
AAEL006014	supercont1.186	Unk_Ch	heme peroxidase HPX1	1,52	1,28	1,66	1,74	1,75	1,67	-1,08	1,00	1,04	1,05	0,84	1,05	-0,09	0,92	1,01
AAEL006795	supercont1.221	chr3	cytochrome P450 CYP9J15	1,03	-1,05	1,40	1,37	1,20	1,05	1,70	1,77	1,59	1,68	-1,02	0,98	-0,15	1,04	1,06
AAEL006798	supercont1.221	chr3	cytochrome P450 CYP9J10	1,07	1,02	1,63	1,74	1,40	1,40	-1,31	-1,18	-1,41	-1,05	0,96	1,07	-0,01	0,90	0,75
AAEL006805	supercont1.221	chr3	cytochrome P450 CYP9J2	-1,04	-1,07	1,08	1,10	-1,04	-1,15	1,38	1,42	1,48	1,69	1,03	1,01	-0,12	1,03	1,15
AAEL006811	supercont1.221	chr3	cytochrome P450 CYP9J8	1,31	1,13	2,17	2,01	1,81	1,44	1,83	1,92	1,82	1,91	0,86	0,93	-0,37	1,05	1,05
AAEL006814	supercont1.221	chr3	cytochrome P450 CYP9J20	1,22	1,10	2,26	2,07	1,80	1,68	2,00	1,96	1,86	1,97	0,90	0,91	-0,12	0,98	1,06
AAEL006815	supercont1.221	chr3	cytochrome P450 CYP9J16	-1,04	-1,09	1,20	1,21	-1,01	-1,07	1,65	1,78	1,79	2,00	1,05	1,01	-0,06	1,08	1,12
AAEL007951	supercont1.291	Unk_Ch	glutathione transferase GSTE2	-1,38	-1,57	3,01	3,04	2,86	2,62	-1,32	-1,18	-1,03	-1,07	1,13	1,01	-0,24	0,90	1,04
AAEL009119	supercont1.371	chr2	conserved hypothetical protein	1,50	1,36	1,44	1,64	1,23	1,18	1,17	1,08	-1,12	-1,22	0,90	1,13	-0,05	0,93	1,08
AAEL011835	supercont1.620	Unk_Ch	voltage-gated potassium channel	1,07	-1,03	1,26	1,01	-1,18	1,04	2,18	2,17	1,96	2,18	-0,97	0,80	2,22	0,99	1,11
AAEL012491	supercont1.702	chr1	cytochrome P450 CYP6P12	-1,77	-2,28	1,60	2,02	1,60	1,85	-2,11	-4,58	-2,65	-3,48	1,29	1,26	0,25	2,17	1,31
AAEL012492	supercont1.702	chr1	cytochrome P450 CYP6AA5	-1,64	-1,61	1,85	2,31	1,55	1,89	-2,10	-4,12	-1,47	-2,24	0,98	1,25	0,34	1,97	1,52
AAEL013556	supercont1.869	Unk_Ch	cytochrome P450 CYP4J15	1,42	1,48	1,00	-1,06	-1,43	-1,21	1,41	1,59	1,57	1,69	1,04	-1,06	0,22	1,13	1,08
AAEL013972	supercont1.975	Unk_Ch	sulfotransferase	1,05	1,27	1,42	2,13	1,60	2,00	-1,85	-2,52	-1,44	-1,78	1,21	1,49	0,41	1,36	1,24
AAEL013976	supercont1.975	Unk_Ch	sulfotransferase	-1,04	-1,02	1,41	1,85	1,17	1,92	-1,47	-1,64	-1,26	-1,58	0,97	1,32	0,75	1,12	1,25
AAEL014371	supercont1.1092	Unk_Ch	glycosyltransferase	1,58	1,71	-1,31	-1,53	-2,34	-1,66	1,55	1,73	-1,14	-1,07	1,09	1,17	0,69	1,12	0,94
AAEL014603	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J30	-1,08	-1,19	1,05	1,01	1,14	1,04	1,43	1,52	1,40	1,48	1,11	0,96	-0,10	1,06	1,05
AAEL014607	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J?	1,05	-1,05	1,40	1,47	1,67	1,39	1,52	1,60	1,73	1,83	-1,00	1,06	-0,28	1,06	1,06
AAEL014608	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J?	-2,43	-2,57	1,69	1,45	1,82	1,99	1,04	1,01	1,46	1,74	1,06	0,86	0,16	0,97	1,19
AAEL014612	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J?	1,46	1,31	1,73	1,57	1,98	2,21	1,37	1,75	1,52	1,53	0,90	0,91	0,22	1,28	1,01
AAEL014614	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J?	-1,31	-1,60	2,12	1,92	2,30	2,14	2,74	2,73	3,15	3,32	1,22	0,91	-0,16	1,00	1,05
AAEL014615	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J23	-1,19	-1,22	1,77	1,65	1,72	1,60	1,37	1,33	1,40	1,55	1,03	0,93	-0,12	0,97	1,11
AAEL014617	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J28	1,05	-1,05	1,53	1,55	1,17	1,00	1,52	1,58	1,41	1,42	-1,00	1,02	-0,17	1,04	1,01
AAEL014618	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9F?	-1,27	-1,40	1,76	1,63	2,26	2,35	1,31	1,38	1,41	1,56	1,10	0,93	0,10	1,06	1,11
AAEL014619	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J?	-1,13	-1,41	1,51	1,35	2,29	2,09	1,85	1,85	1,91	1,93	1,25	0,90	-0,19	1,00	1,01
AAEL014667	supercont1.1213	Unk_Ch	brain chitinase and chia	1,19	1,14	1,29	1,29	-1,42	-1,39	1,58	1,68	1,62	1,55	0,96	1,00	0,03	1,06	0,95
AAEL014689	supercont1.1220	Unk_Ch	NADPH cytochrome P450 reductase	-1,29	-1,36	1,50	1,58	1,67	1,70	1,28	1,30	1,33	1,26	1,06	1,05	0,03	1,01	0,95
AAEL014890	supercont1.1327	Unk_Ch	cytochrome P450 CYP6CC1	-1,13	-1,21	1,06	-1,08	-1,06	-1,29	2,74	3,07	2,17	2,39	1,07	-1,02	-0,22	1,12	1,10
AAEL014891	supercont1.1327	Unk_Ch	cytochrome P450 CYP6P?	2,01	1,87	1,29	-1,48	1,10	-1,87	5,81	7,04	5,00	5,80	0,93	-1,15	-2,96	1,21	1,16
AAEL014892	supercont1.1327	Unk_Ch	cytochrome P450 CYP6P?	1,69	1,55	1,00	-1,41	-1,13	-1,75	3,76	4,58	3,56	3,96	0,92	-1,41	-0,63	1,22	1,11
AAEL014893	supercont1.1327	Unk_Ch	cytochrome P450 CYP6BB2	-1,26	-1,42	1,05	-1,04	-1,01	-1,03	2,11	2,39	1,96	2,11	1,12	-0,99	-0,02	1,13	1,08
AAEL015264	supercont1.1678	Unk_Ch	alpha-esterase	1,00	1,26	1,06	1,84	4,11	7,61	-2,68	-2,23	-2,35	-2,33	-1,25	1,74	3,49	0,83	0,99
AAEL015362	supercont1.1912	Unk_Ch	cytochrome P450 CYP325?	2,84	3,19	1,33	1,06	-2,51	-2,56	-2,64	-2,75	-2,67	-3,04	1,12	0,79	-0,05	1,04	1,14
AAEL015563	supercont1.3299	Unk_Ch	cytochrome P450 CYP325?	1,55	1,57	-3,31	-2,92	-3,15	-2,05	1,14	1,03	1,49	1,54	1,01	0,88	1,11	0,90	1,03
AAEL017366	supercont1.1188	chr3	cytochrome P450 CYP9J?	-1,40	-1,50	2,36	2,13	2,60	2,53	1,46	1,49	1,44	1,51	1,07	0,90	-0,07	1,02	1,04

^a. P450 names ending with interrogation marks are not official. Their CYP subfamily is proposed according to best protein homology in mosquitoes.

^b. Differential coverage is indicated for all genes as fold change (FC) between each resistant strain (R+ phenotype) and the mean coverage of all susceptible strains.

^c. Differential coverage is indicated for all genes as fold change (FC) between each R+ phenotype (LD₇₅ survivors) and its R- counterpart (LD₂₅ deads).

Values supporting criteria used for identifying gene amplifications linked to deltamethrin resistance are shown in bold ([R+/mean S] > 1.5 and [R+/R-] > 1).

Supplementary Table 3. Associations between gene amplifications and *kdr* mutations

Supercontig 1.1188						
Population / <i>kdr</i> mutations	AAEL014614 (CYP9J?)		AAEL014615 (CYP9J23)		AAEL014617 (CYP9J28)	
	r	P value	r	P value	r	P value
Nakh_V1016G	0.13	0.672	0.31	0.298	0.61	0.025
Phet_V1016G	-0.55	0.201	-0.75	0.051	-0.30	0.520
Cayn_V1016I	0.36	0.099	-0.28	0.204	-0.22	0.317
StGe_V1016I	0.45	0.064	-0.17	0.499	-0.08	0.756
Nakh_F1534C	-0.07	0.818	-0.24	0.437	-0.58	0.036
Phet_F1534C	0.55	0.201	0.75	0.051	0.30	0.520
Cayn_F1534C	0.34	0.120	-0.13	0.572	-0.02	0.941
StGe_F1534C	0.47	0.059	-0.18	0.486	-0.04	0.890

Supercontig 1.1327						
Population / <i>kdr</i> mutations	AAEL014892 (CYP6BZ?)		AAEL014893 (CYP6BB2)		AAEL014890 (CYP6CC1)	
	r	P value	r	P value	r	P value
Nakh_V1016G	0.15	0.635	-0.25	0.417	-0.25	0.409
Phet_V1016G	-0.45	0.317	-0.07	0.888	-0.03	0.942
Cayn_V1016I	-0.09	0.689	-0.14	0.541	0.06	0.800
StGe_V1016I	-0.14	0.570	-0.27	0.285	-0.23	0.365
Nakh_F1534C	-0.07	0.817	0.28	0.363	0.26	0.393
Phet_F1534C	0.45	0.317	0.07	0.888	0.03	0.942
Cayn_F1534C	-0.21	0.347	-0.26	0.240	0.08	0.725
StGe_F1534C	-0.09	0.721	-0.21	0.410	-0.19	0.456

Supercontig 1.142						
Population / <i>kdr</i> mutations	AAEL005112 (CCEAE3A)		AAEL005101 (CCEAE4A)		AAEL005122 (CCEAE6A)	
	r	P value	r	P value	r	P value
Nakh_V1016G	0.08	0.796	0.10	0.757	0.10	0.743
Phet_V1016G	0.39	0.390	0.31	0.495	0.33	0.464
Cayn_V1016I	0.12	0.602	0.29	0.183	0.12	0.607
StGe_V1016I	-0.06	0.811	-0.05	0.846	0.10	0.700
Nakh_F1534C	-0.07	0.809	-0.07	0.809	-0.11	0.730
Phet_F1534C	-0.39	0.390	-0.31	0.495	-0.33	0.464
Cayn_F1534C	0.09	0.702	0.10	0.659	-0.04	0.858
StGe_F1534C	-0.03	0.907	-0.03	0.911	0.12	0.660

For each population, the amplification level of each gene was correlated with *kdr* mutation genotype (homozygote wildtype: 0, heterozygote 0.5, homozygote resistant: 1) across all individuals. Correlation coefficient and their associated P value are shown. Values in bold were considered significant ($P < 0.05$).

Supplementary Table 4. Polymorphism variations dataset.

http://genome.cshlp.org/content/suppl/2015/07/13/gr.189225.115.DC1/Supplemental_Table_4_polymorphism_dataset.xlsx

Supplementary Table 5. Description and location of all captured genes.

http://genome.cshlp.org/content/suppl/2015/07/13/gr.189225.115.DC1/Supplemental_Table_5_captured_genes.xlsx

Supplementary Table 6. Primers used for qPCR.

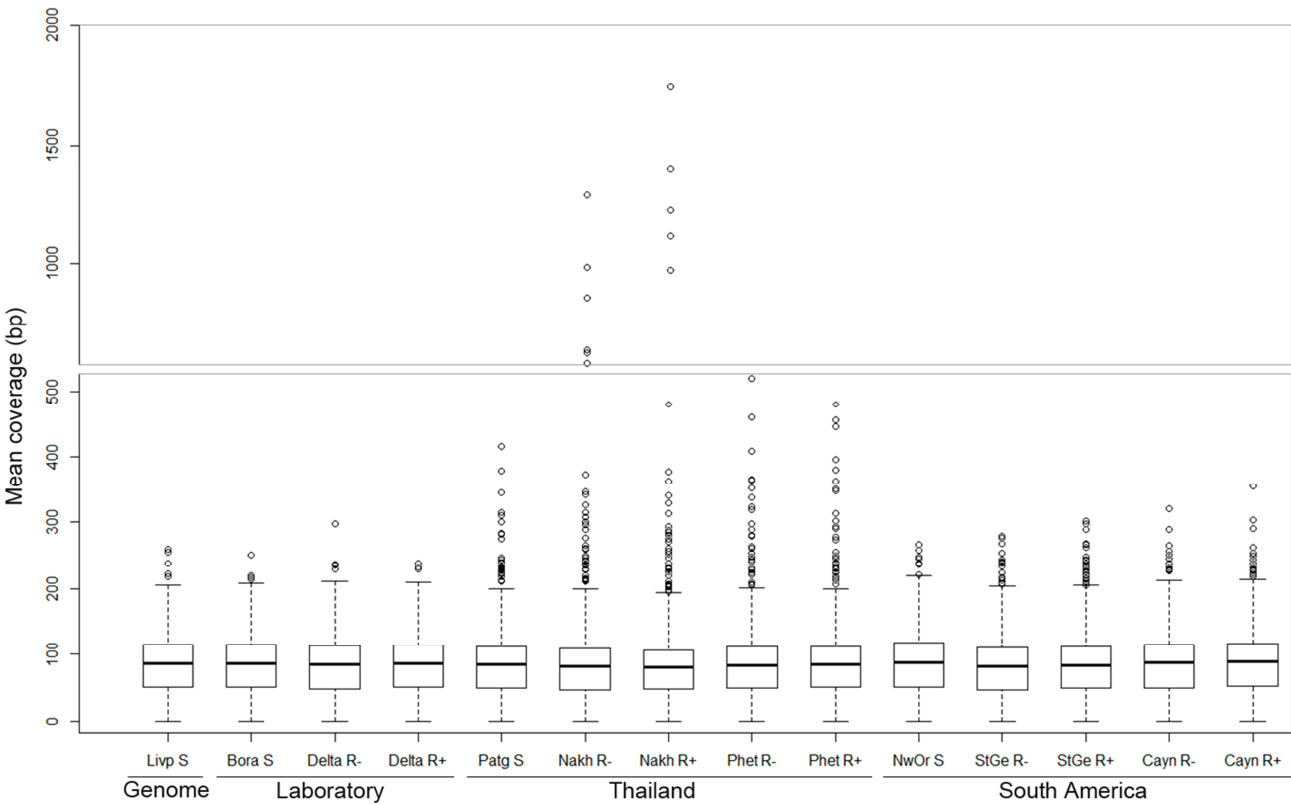
Accession number	Gene name ^a	forward primer (5'-3')	reverse primer (5'-3')	Product length (bp)
AAEL014614	CYP9J?	GGAAGCGTTGAGCATGTGTG	AACTGTGAAACCGTGGGGTC	121
AAEL014615	CYP9J23	AGAATCCACGAAGCGATGAG	CTATCCAGGGCGGCAATG	122
AAEL014617	CYP9J28	CTATTTCGGAGTCCTAGTGGCC	CTTTGACTCCTCGGTACTTGTCG	197
AAEL014891	CYP6P?	TTCACCTTCAGCGAAGACCC	GATTAGGTGCGGCGTCCTTA	152
AAEL014893	CYP6BB2	AGTTCAAGGGCCGAGGATTG	CGGATCCACGAAAATTCCGC	143
AAEL014890	CYP6CC1	CGAACGTTGCGTTCTTGTT	CCGGGCCTTCAAATCTCTGT	185
AAEL005112	CCEAE3A	TCTAAGAAACCCGAATATGACG	TTGAGGAGGCACGAACAG	130
AAEL005101	CCEAE4A	GTAAATGCCGGAGAAACGGC	ACCATTTTTTCGCCATTGGGC	89
AAEL005122	CCEAE6A	TGGCTCCAGTCGAGGTAGAA	AAGTTGGTCCACATGCGACA	76
AAEL005950	AAEL005950	TCCGGTTCCGTCTGGTATCT	GTGTGTGTAACGGCTCCAGA	186
AAEL007808	CYP4D39	AGTCCTGGAAGTTCTGCACG	AAGGCGACTTTCCGACGAAT	132
AAEL000987	RPL8	CTGAAGGGAACCGTCAAGCAA	TCGGCGGCAATGAACAACT	119
AAEL009496	RPS7	GTTGGAGATGAACTCGGACCTG	GCCTTCTTGCTGTTGAACTCG	87

^a. P450 names ending with interrogation marks are not official. Their CYP subfamily is proposed according to best protein homology in mosquitoes.

Supplementary Figures

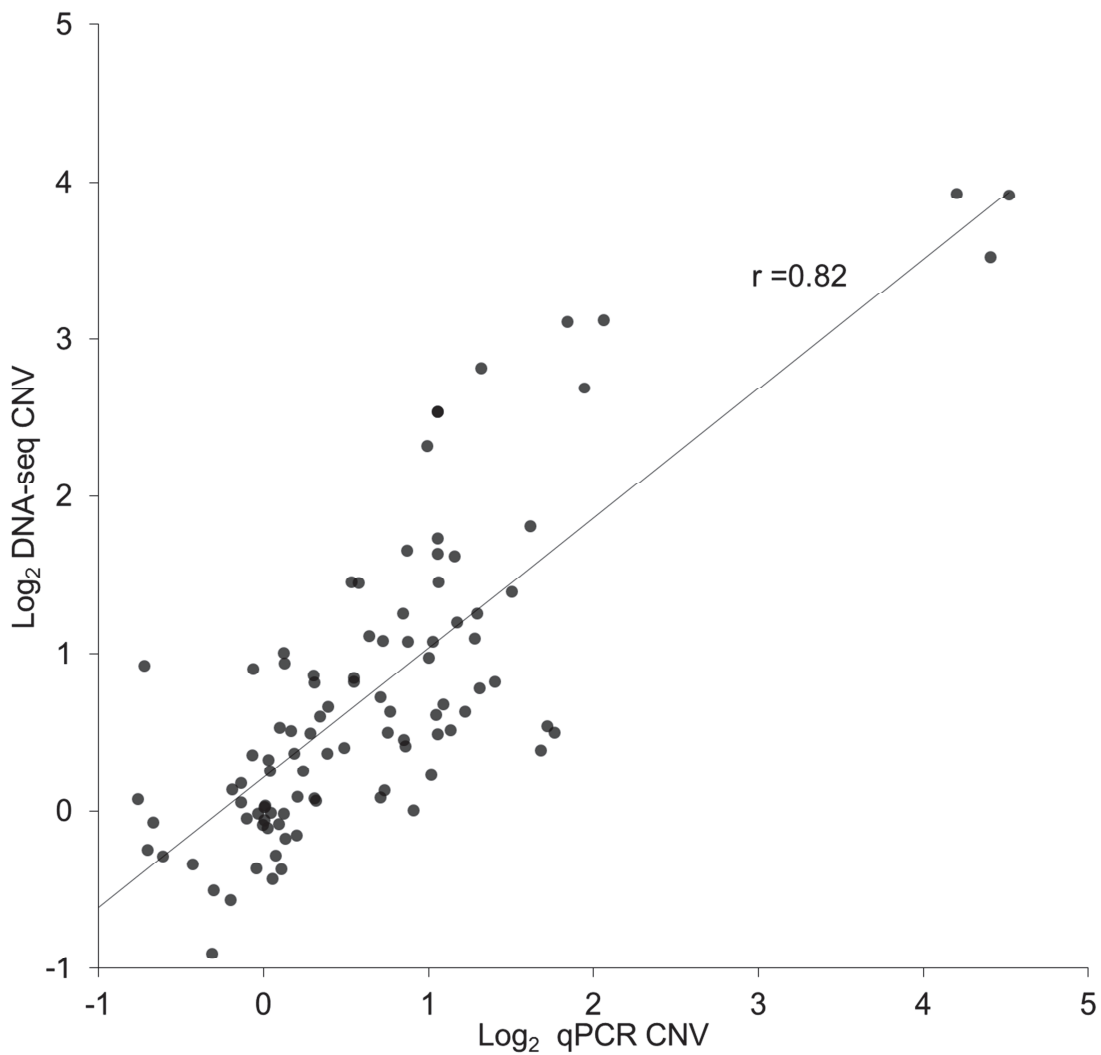
Supplementary Figure 1. Sequencing coverage across captured regions.

Box plots show the coverage distribution for all captured regions across all samples. Mean coverage is shown as a solid line within box. Interquartiles are shown as whiskers and outliers as dots.



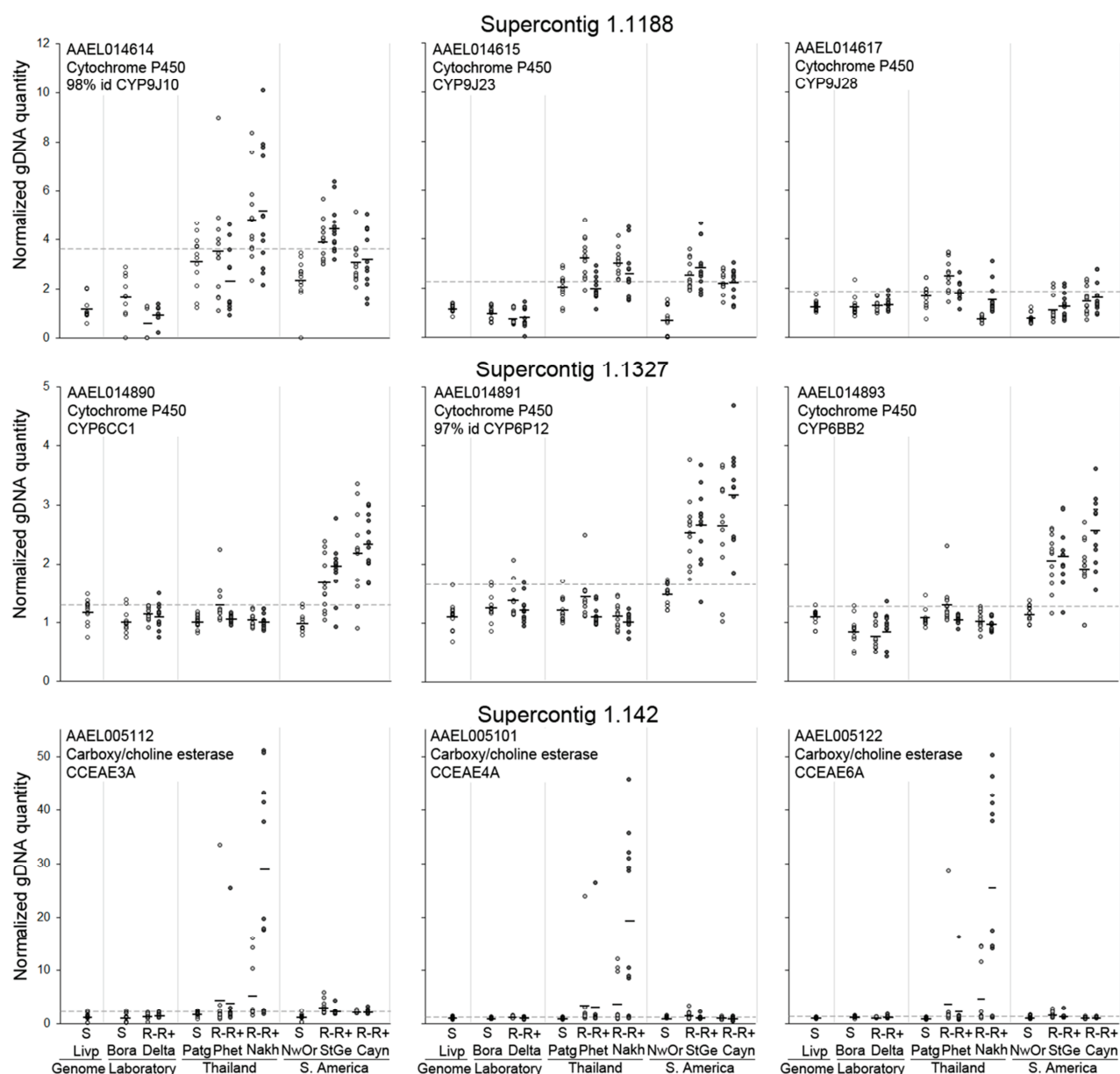
Supplementary Figure 2. Cross-comparison of CNV data obtained by DNA-seq and qPCR.

Each dot represents the CNV of one gene in one resistant population/phenotype versus all susceptible strains. For qPCR, the mean CNV across all individuals was used. Pearson's correlation coefficient is shown.



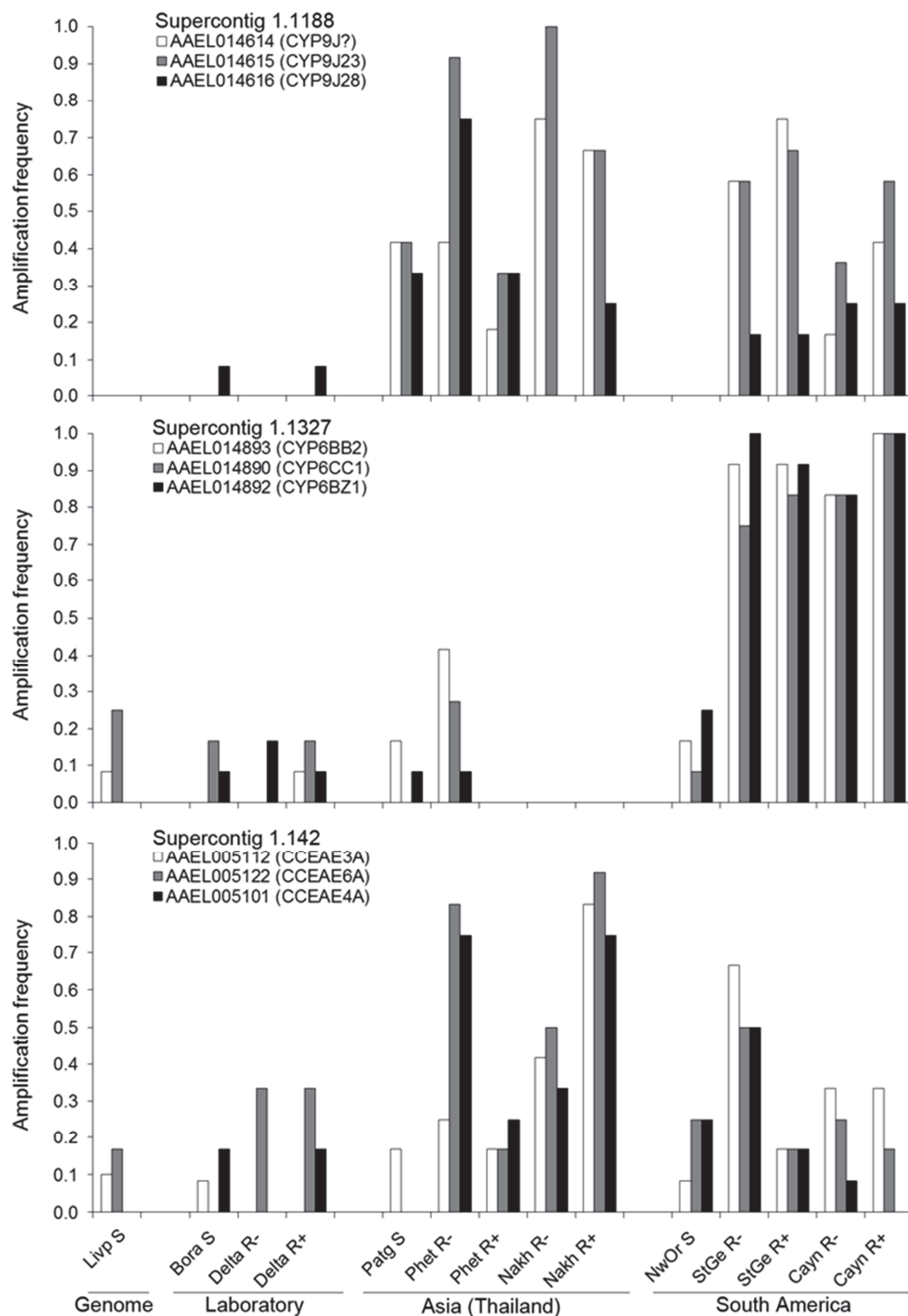
Supplementary Figure 3. Gene amplification levels on individual mosquitoes.

Nine candidate genes from three distinct supercontigs were targeted for validation. CNV were analyzed by qPCR on gDNA extracted from 12 individual mosquitoes per population/phenotype. For each gene, relative genomic DNA quantity is shown for each mosquito across all populations. Quantitative PCR data were normalized according to two genes displaying no amplification across all individuals and conditions and are presented as gDNA quantity relative to one individual of the susceptible Livp population. White, grey and black circles represent S, R- and R+ individuals respectively. Horizontal marks show the mean gDNA quantity of each population. Horizontal dotted grey lines show the upper 90% quantile of individuals from all susceptible populations.



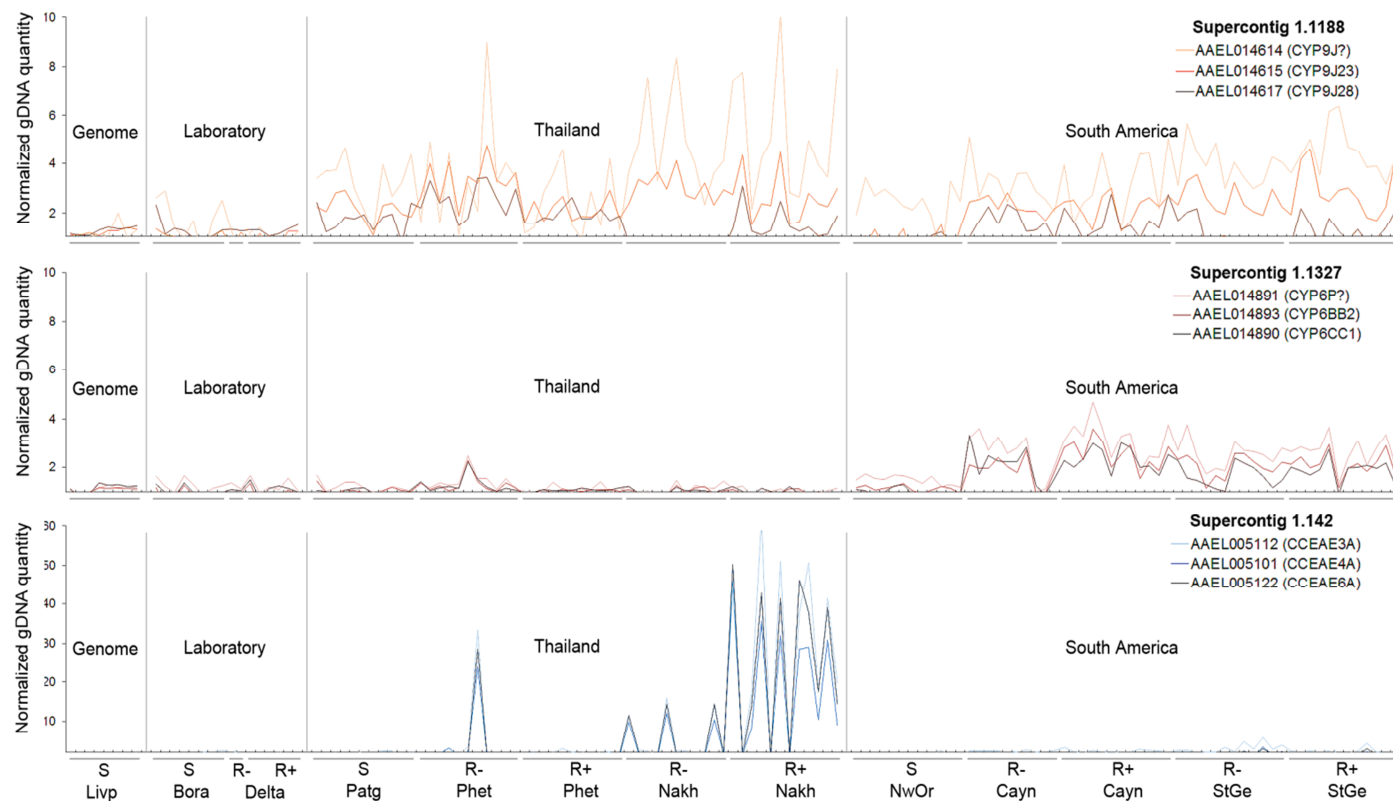
Supplementary Figure 4. Gene amplifications frequencies across populations.

Nine candidate genes from three distinct supercontigs were analyzed. For each gene, individuals showing a CN higher than the 0.9 quantile of CNs observed among individuals from all susceptible populations were considered affected by gene amplification.



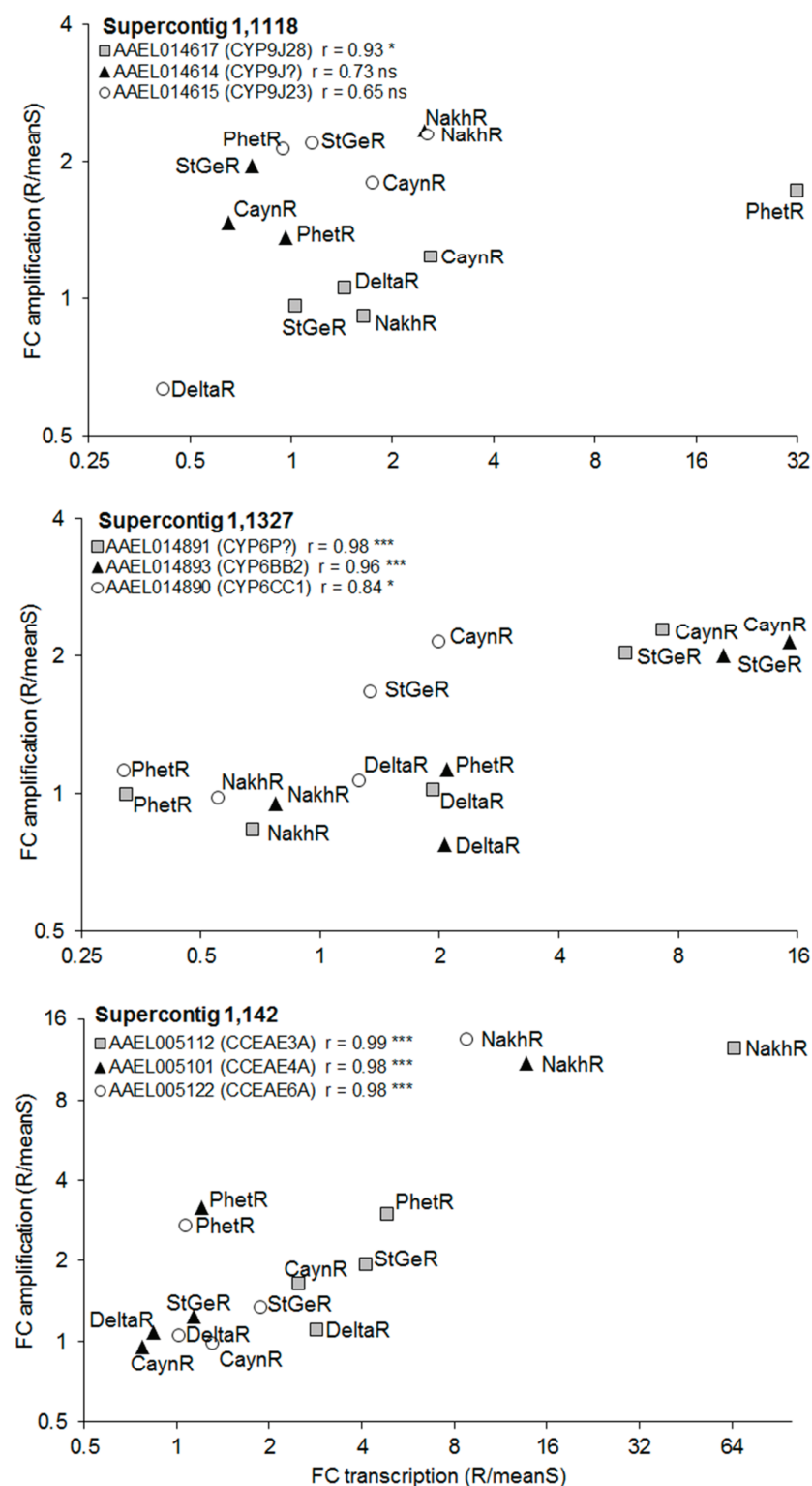
Supplementary Figure 5. Comparison of CNV profiles across populations and individuals.

Individual CNV data obtained by qPCR are presented for nine genes located in three different supercontigs. Only individuals from which reliable qPCR signal were obtained for all genes are shown. Normalized gDNA quantities < 1 are masked for clarity. Individuals are sorted by geographic regions, populations and phenotypes (R- or R+).



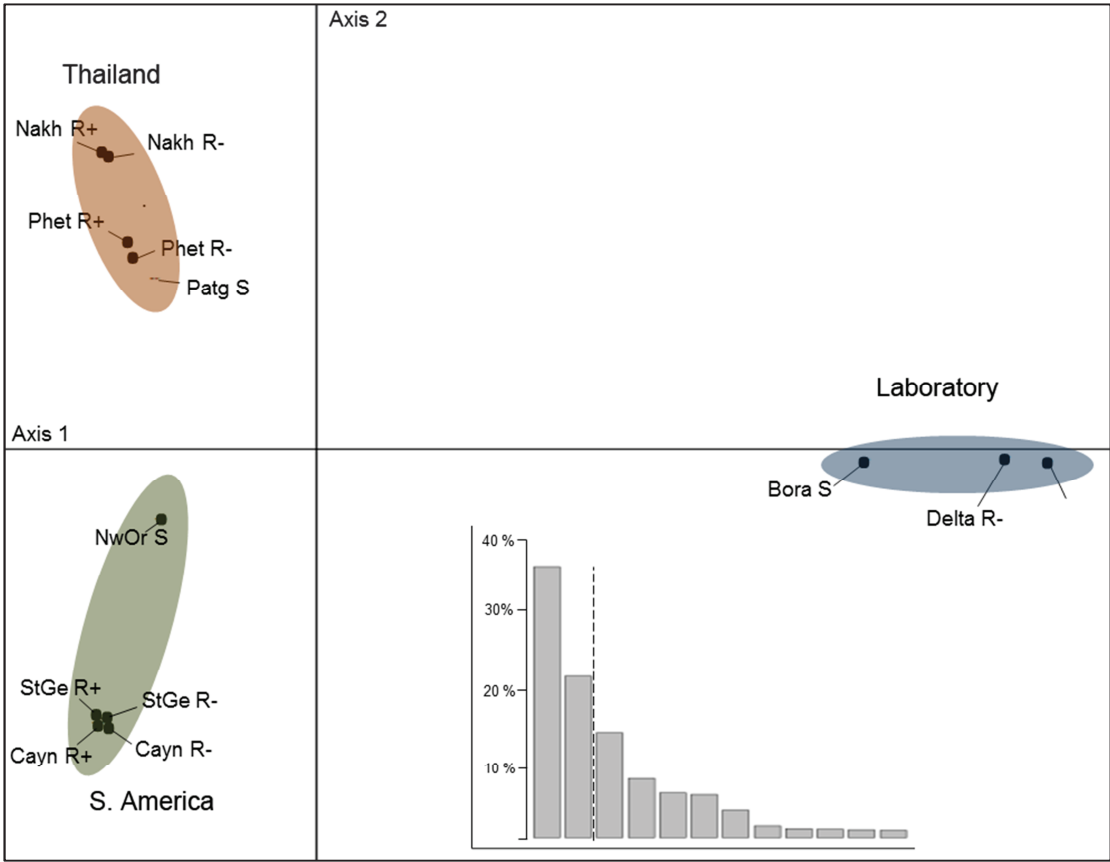
Supplementary Figure 6. Impact of gene amplifications on transcription levels.

Nine genes were studied across 3 different supercontigs. Gene amplifications levels were extracted from sequencing data. Transcription levels were estimated by RT-qPCR on 3 independent biological replicates. Both gene amplification and transcription levels are expressed as fold change versus the mean of all susceptible populations (R/meanS). Correlation coefficients and their respective P values are shown for each gene (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).



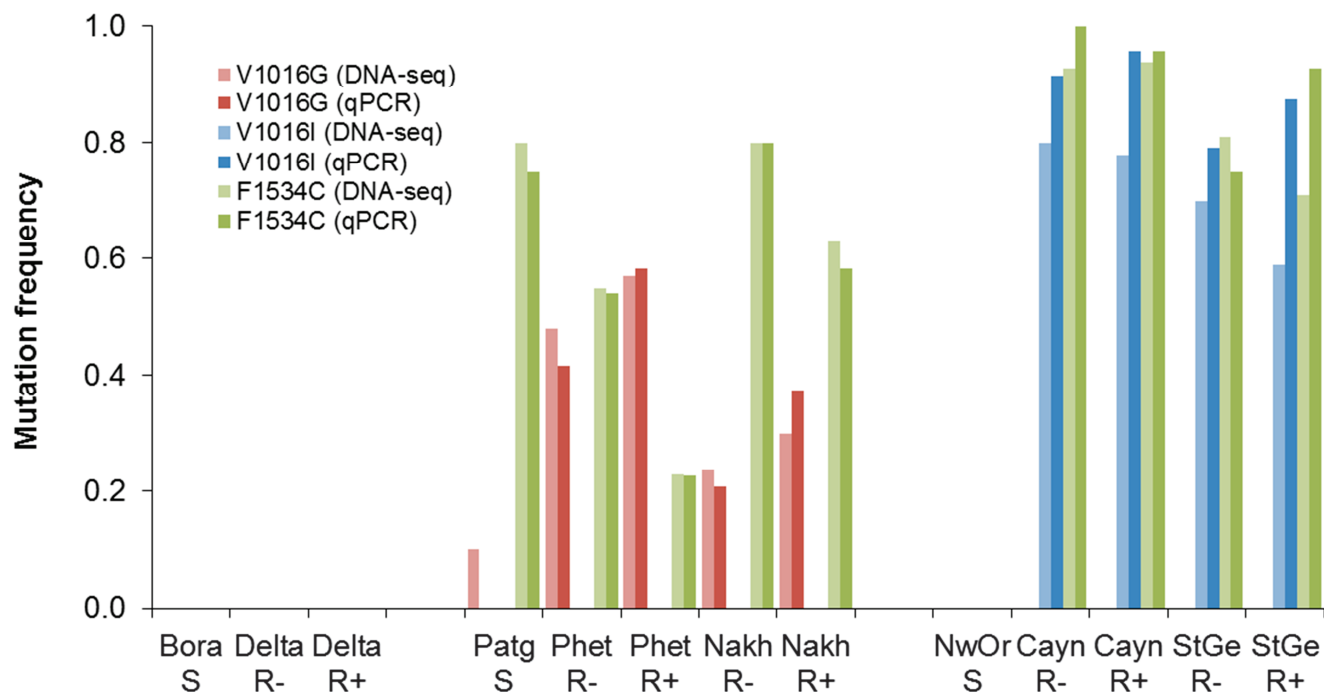
Supplementary Figure 7. Population structure deduced from PCA analysis.

A total of 30400 polymorphic substitutions were used for PCA analysis. PCA was computed from the allele frequencies of all polymorphic substitutions across populations. The first two axes representing almost 60% of variability are represented. The three geographical groups are colored.



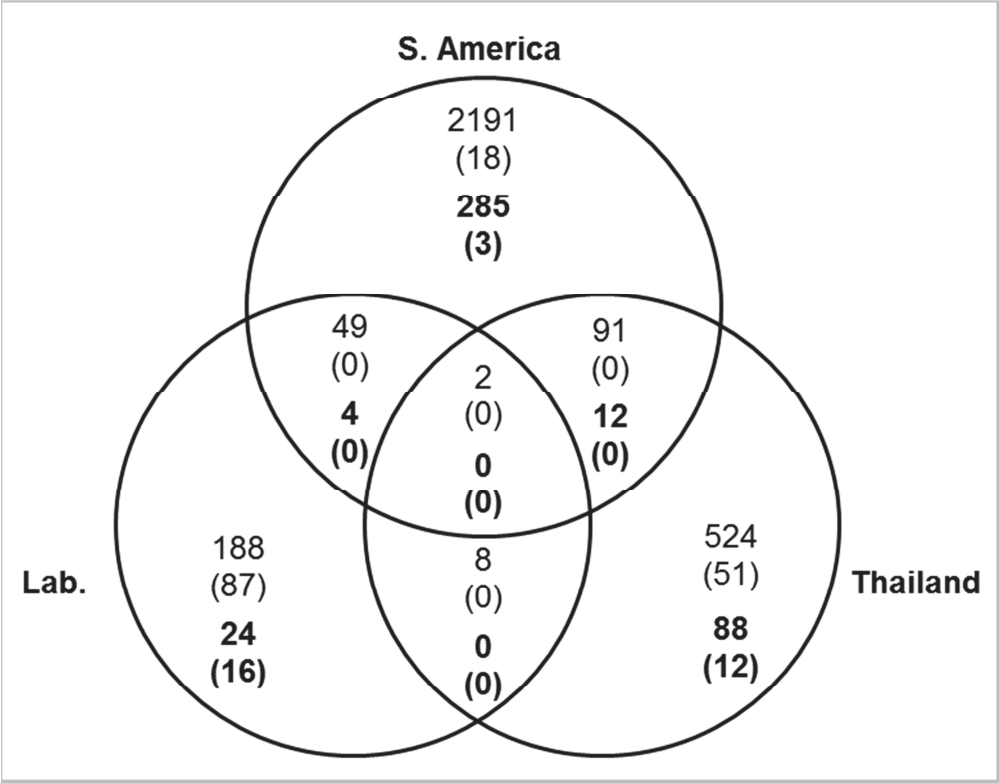
Supplementary Figure 8. Comparison of *kdr* frequencies between DNA-seq and qPCR.

For DNA-seq, *kdr* frequencies were estimated from pools of 130 individual based on the number of reads supporting each allele at each locus. For allele-specific qPCR, *kdr* frequencies were deduced from the genotype of 12 mosquitoes per population/phenotype.



Supplementary Figure 9. Comparison of Bayesian and frequency filtering approaches.

The numbers of polymorphism variations associated with deltamethrin resistance identified by each approach are shown for each geographical group. The frequency-based filtering approach includes all variation types (SNPs, MNPs and InDels) while the Bayesian approach only included substitutions. Loci identified by frequency-based filtering are shown as normal typing while those identified by the Bayesian approach are shown within brackets. Non-synonymous variations are shown in bold.



Chapitre IV:

Etude des bases moléculaires de la résistance aux pyréthrinoïdes par combinaison des techniques de RNA-seq et DNA-seq

I. Contexte et approches utilisées

La première partie de cette thèse a permis de confirmer la puissance de l'outil RNA-seq pour identifier les gènes différemment exprimés chez les populations de moustiques résistantes aux insecticides mais aussi pour réaliser un screening global des variations de polymorphisme des zones codantes en relation avec la résistance. Cette étude préliminaire a également mis en évidence la nécessité de travailler sur des populations naturelles afin d'obtenir une vision réaliste des mécanismes de résistance acquis par les populations de terrain. La deuxième partie a ensuite permis de montrer que l'association des techniques d'enrichissement génomique et de séquençage haut débit permettait une analyse fine des bases génomiques de la résistance. Cette étude a notamment permis d'identifier des variations alléliques non-synonymes des enzymes de détoxification fortement enrichies chez les populations résistantes supportant l'hypothèse de la sélection de variants enzymatiques ayant un potentiel de détoxification des insecticides accru. Cette étude a également démontré que la sur-expression de certains gènes codants pour des enzymes de détoxification chez les populations résistantes était la conséquence d'une augmentation du nombre de copies de ces gènes. Néanmoins, la **sur-expression** de certains gènes fréquemment identifiés dans les études de transcriptomique ne semble **pas être la conséquence** de phénomène **d'amplification génique**. Dans ce cas, il est possible que l'expression de ces gènes soit régulée par des variations de polymorphisme présentes dans leurs **régions régulatrices** (éléments *Cis*) permettant ou empêchant le recrutement de facteurs de transcription (éléments *Trans*-régulateurs). Bien que ces variations de polymorphisme représentent elles aussi de très bons marqueurs ADN de la résistance métabolique, elles n'ont été pour l'instant que très peu étudiées chez les moustiques (Liu 2015). L'identification de tels marqueurs permettrait de compléter le panel de marqueurs génomiques (CNV et variations non-synonymes)

précédemment identifiés en vue de développer un panel de marqueurs diagnostiques des différents types de résistance chez les moustiques.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette troisième étude était de **combinaison des techniques de RNA-seq et de DNA-seq** pour étudier les relations entre l'expression différentielle des enzymes de détoxification et les modifications de leurs zones *cis*-promotrices en lien avec la résistance aux insecticides pyréthrinoides. Afin de réaliser un screening large et robuste et d'obtenir les niveaux d'expression des gènes potentiellement impliqués dans la résistance, la technique de RNA-seq a été appliquée aux populations résistantes et sensibles décrite dans le chapitre précédent. Ainsi, nous avons combiné des données d'expression issues de RNA-seq avec des données de polymorphisme issues d'une analyse par DNA-seq ciblée sur les zones *cis*-promotrices (maximum 1 kb en amont du codon ATG) de l'ensemble de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux insecticides (voir chapitre III pour la description des gènes ciblés). L'approche par RNA-seq a également permis de générer des données de polymorphisme à l'intérieur des transcrits en lien avec la résistance aux pyréthrinoides. Ces variations de polymorphisme ont été mises en regard de celles obtenues avec l'approche par DNA-seq ciblée (décrite dans la partie précédente) afin d'étudier les événements **d'expression d'allèles spécifiques** (ASE) en lien avec la résistance à la deltaméthrine.

Publication III:

Titre: Identification of novel insecticide resistance markers in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using complementary NGS approaches.

Auteurs: Frederic Faucon, Isabelle Dusfour, Thierry Gaudé, Vincent Navratil, Frederic Boyer, Fabrice Chandre, Patcharawan Sirisopa, Kanutcharee Thanispong, Waraporn Juntarajumnong, Rodolphe Poupardin, Theeraphap Chareonviriyaphap, Romain Girod, Vincent Corbel, Stephane Reynaud and Jean-Philippe David

Année de publication : En préparation

Contribution personnelle : ma contribution pour l'échantillonnage est la même que pour la publication II, et j'ai également réalisé l'ensemble des manipulations et analyses présentées dans cet article.

II. Matériel et Méthodes

Matériel biologique et séquençage

Huit populations d'*Ae. aegypti* provenant d'Asie, d'Amérique du Sud et de Laboratoire résistantes ou sensibles à la deltaméthrine ont été phénotypées et utilisées dans cette étude. Ces **populations** sont **identiques** à celles utilisées dans l'étude précédente (Publication II). De plus, de façon à pouvoir croiser les données de RNA-seq et de DNA-seq, les échantillons utilisés proviennent des **mêmes cohortes** (même génération) d'individus utilisés dans le chapitre précédent. Les échantillons sont ainsi composés de femelles non gravides âgées de 2 à 4 jours. Pour l'étude de RNA-seq, 3 réplicats de 30 femelles non-exposées aux insecticides ont été échantillonnés par population. Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit RNAqueous 4 PCR selon les recommandations du fabricant et resuspendus dans 50 µL d'eau ultra-pure. La préparation des librairies de RNA-seq et le séquençage illumina ont été effectués par la société Hybrigenics-Helixio (Clermond-Ferrand, France). Trois librairies par population ont ainsi été préparées à partir de 400 ng d'ARN total chacune, multiplexées puis séquencées en paires de fragments de 75 pb sur un séquenceur Genome Analyzer IIx (Illumina).

Traitement des séquences

Les séquences obtenues ont été démultiplexées et les adaptateurs de séquençage retirés. La qualité des séquences a été vérifiée en utilisant FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). Les séquences ont ensuite été **filtrées** sur leur longueur, leur appariement (pairing) et leur qualité grâce à Trimmomatic (Bolger et al. 2014) en utilisant les paramètres suivants : Leading:25 ; Trailing:25 ; Minlen: 60; Slidingwindow:4-25. L'**alignement** des séquences sur le génome de référence d'*Ae. aegypti* (AaegL3) a été ensuite réalisé en utilisant l'algorithme Tophat2 (Kim et al. 2013) implémenté sous Galaxy (<http://galaxyproject.org>) avec les paramètres suivants : différences de nucléotides autorisées par read=3; longueur d'intro min-max = 45-300000 pb et recherche de couverture=OK. Seules les séquences alignées de façon unique et appariée ont été utilisées pour la quantification de l'expression et l'analyse des variations de polymorphisme.

Analyse des données d'expression

Le calcul des RPKMs²⁰ a été effectué en utilisant l'algorithme Cufflink (Trapnell et al. 2011) implémenté sous Galaxy en utilisant les paramètres suivants : méthode de normalisation des bibliothèques=géométrique ; méthode d'estimation de la dispersion par condition ; nombre minimal d'alignements = 10 ; correction des reads multiples et de la correction du biais=OK. Le transcriptome de référence (Aaegl3) du moustique *Ae. aegypti* disponible sous Vectorbase (www.vectorbase.org) a été utilisé pour l'annotation des transcrits. Les **rapports d'expression** ont été calculés entre chaque couple de populations résistante-sensible et en prenant en compte les réplicats biologiques en utilisant l'algorithme Cuffdiff (Trapnell et al. 2011). Les gènes ont alors été considérés comme différentiellement exprimés si leur niveau d'expression chez au moins une population résistante était au minimum 3 fois supérieur ou inférieur (fold > 3 ou < -3) à chacune des trois populations sensibles avec une q-value <0.001.

Analyse des données de polymorphisme

Pour l'analyse des **variations de polymorphisme** dans les transcrits, les séquences issues du RNA-seq alignées et filtrées avant d'être chargées dans le logiciel Strand NGS (Agilent). Les variations par rapport au génome de référence (Aaegl3) ont été détectées avec les paramètres suivants : ignorer les *loci* présentant un homopolymer > 10 pb; ignorer les *loci* présentant une couverture inférieure à 10 reads; ignorer les *loci* présentant moins de 2 séquences variantes; score de détection minimum = 50. Pour l'analyse, seules les **substitutions** (SNPs) ont été retenues. Les SNPs montrant une différence de fréquence entre une population résistante et les trois populations sensibles de plus de 40 % (enrichissement ou appauvrissement) ont été considérés comme associés à la résistance (SNP différentiels).

Le séquençage par DNA-seq a été réalisé sur les **régions cis-promotrices** (au maximum 1 kb en amont des gènes) des 789 gènes d'intérêt décrits dans le chapitre précédent. Les échantillons d'ADN génomiques ainsi que le protocole d'extraction et de séquençage utilisés sont identiques à ceux décrits dans le chapitre précédent (Publication II). Les séquences obtenues ont été filtrées et alignées sur le génome de référence d'*Ae. aegypti* puis les variations de polymorphisme ont été détectées selon le même principe que celui utilisé

²⁰ "Reads Per Kilobase of transcripts per Million reads in the library", méthode de normalisation de l'expression en RNA-seq, voir Figure 15.

dans la publication II. La fréquence de ces variations a ensuite été corrélée sur l'ensemble des 8 populations avec le niveau d'expression (RPKM) des gènes localisés en aval. Seuls les gènes sur-exprimés en lien avec la résistance ont été considérés pour cette analyse de corrélation. Les variations de polymorphisme des séquences promotrices de ces gènes montrant une corrélation significatives avec l'expression (RPKM ou $\log_2(\text{RPKM})$) ont ensuite été analysées plus finement afin de déterminer leur impact sur des motifs conservés de fixation de facteurs de transcription. Cette analyse *in silico* des **motifs** a été réalisée avec le logiciel PROMO 3.0.2, permettant de détecter les **sites de fixation de facteurs de transcription** modifiés dans les populations résistantes par rapport aux populations sensibles. Seuls les éléments de régulation montrant une probabilité inférieure à 8% d'être détectés par hasard (élimination des motifs courts) et une dissimilarité de séquence par rapport aux matrices consensus <5% ont été considérés.

Méthode de détection de l'expression d'allèles spécifiques

Les évènements d'expression d'allèles spécifiques ont été détectés en **comparant les fréquences alléliques** des variations de polymorphismes détectées par l'approche RNA-seq avec celles obtenues par l'approche DNA-seq (Publication II). Les coefficients de corrélation (R, Pearson) des fréquences alléliques ont été calculés par gène. Afin de déterminer les gènes les plus impactés par ces évènements, un seuil sur ces coefficients de 0.84 a été déterminé, ce qui correspond à la borne inférieure de la moyenne des R sur tous les gènes (moyenne-écart type).

III. Résultats

Ce travail nous a permis d'effectuer un **screening global** des gènes différemment transcrits et des variations de polymorphisme associées à la résistance à la deltaméthrine. Les résultats obtenus ont été analysés afin d'évaluer l'étendue de l'impact des amplifications géniques précédemment décrites dans le chapitre précédent sur l'expression des gènes concernés. Ce travail a également permis d'étudier les phénomènes d'expression d'allèles spécifiques en lien avec la résistance et d'identifier des mutations dans les régions cis-promotrices liées à la sur-expression des enzymes de détoxification.

Expression différentielle et gènes candidats

Le séquençage a été réalisé avec succès, générant près d'un milliard de séquences réparties sur l'ensemble des échantillons (**Tableau 5**). Après filtrage sur la qualité des séquences et de l'alignement, environ 60% des séquences ont été alignées avec succès sur le génome d'*Ae. aegypti*.

		Bora S		Livp S		NwOr S		Delta R		Nakh R		Phet R		Cayn R		StGe R		Total	
		reads (x10 ⁶)	%	reads (x10 ⁶)	%	reads (x10 ⁶)	%	reads (x10 ⁶)	%	reads (x10 ⁶)	%	reads (x10 ⁶)	%	reads (x10 ⁶)	%	reads (x10 ⁶)	%	reads (x10 ⁶)	%
Séquencés	Total	121,9	100	142,3	100	83,6	100	98,7	100	127,4	100	114,7	100	120,6	100	119,3	100	928,4	100
	Réplicat 1	39,3		43,3		23,9		30,1		43,4		38,7		39,1		39,4			
	Réplicat 2	41,1		51,7		30,1		35,5		43,4		34,5		44,4		44,6			
	Réplicat 3	41,4		47,3		29,6		33,1		40,6		41,5		37,1		35,2			
	Moyenne	40,6		47,4		27,9		32,9		42,5		38,2		40,2		39,8			
Filtre de qualité des reads	Total	111,9	91,8	131,2	92,2	77,0	92,1	91,2	92,5	116,8	91,7	105,5	92,0	111,1	92,2	110,2	92,4	855,0	92,1
	Moyenne	37,3		43,7		25,7		30,4		38,9		35,1		37,1		36,7			
Alignés sur le génome puis filtre de qualité sur l'alignement	Total	66,2	54,3	82,2	57,7	47,0	56,2	54,1	54,8	71,2	55,9	64,8	56,5	69,4	57,5	69,6	58,4	524,4	56,5
	Moyenne	22,1		27,4		15,7		18,0		23,7		21,6		23,1		23,2			

Tableau 5: Statistiques de séquençage et d'alignement des séquences obtenues.

L'analyse d'**expression différentielle** a été réalisée sur les transcrits montrant un signal d'expression supérieur à 0,5 RPKM dans les deux conditions comparées. Afin de prendre en compte les transcrits non-exprimés dans certaines conditions, un deuxième critère impliquant que la somme des RPKM des deux conditions comparées soit supérieure à 1 a aussi été appliqué. Parmi les 15491 transcrits ainsi retenus, 7614 ont été annotés et assignés aux 15 catégories biologiques présentées dans la **Figure 20**. Parmi eux, 200 transcrits apparaissent différemment exprimés (rapport d'expression >3 ou < -3 et q-value <0,001) dans au moins une population résistante par rapport aux trois populations sensibles, avec 118 gènes sous-exprimés et 84 gènes sur-exprimés (**Figure 20a**). Aucun de ces gènes n'apparaît différemment exprimé dans toutes les populations résistantes étudiées, et seulement 18% d'entre eux présentent des profils de transcription communs entre populations d'une même région géographique.

L'analyse des **catégories fonctionnelles** (**Figure 20b.**) affectées par une expression différentielle en lien avec la résistance montre que les gènes codants pour des enzymes de détoxification telles que les CCEs, les GSTs et les P450s sont significativement plus affectés par des phénomènes de sur-expression géniques, tandis qu'aucune catégorie fonctionnelle n'apparaît enrichie au sein des gènes sous-exprimés.

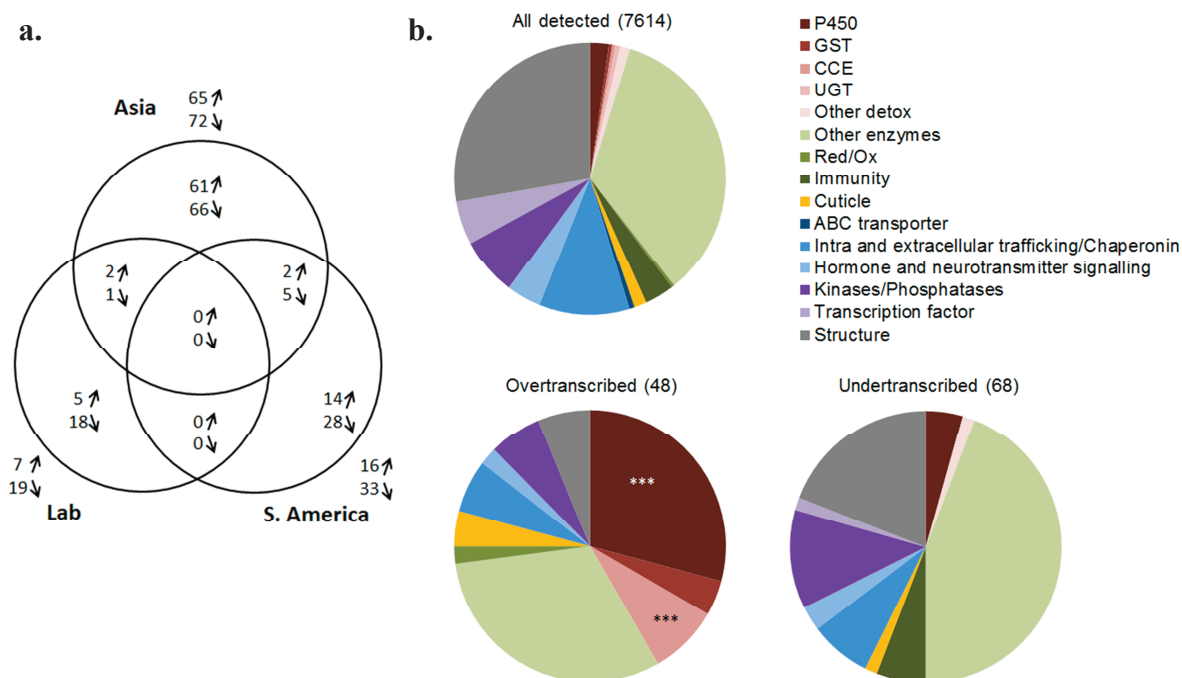


Figure 20: Expression différentielle des gènes détectés **a.** Distribution des gènes différentiellement transcrits par rapport aux populations sensibles dans les régions géographiques étudiées. Les flèches montantes ou descendantes indiquent respectivement le caractère de sur-transcription ou de sous-transcription. **b.** Catégories fonctionnelles associées aux gènes différentiellement transcrits dans les populations résistantes par rapport aux populations sensibles. *** indiquent un enrichissement significatif de la catégorie concernée par rapport à l'ensemble des gènes annotés détectés.

Une analyse par clustering hiérarchique des rapports d'expression des 21 gènes de détoxification surexprimés chez les populations résistantes (**Figure 21**) montre des profils d'expression différents entre régions géographiques, mais bien conservés entre populations d'une même région. La plupart de ces gènes sont sur-exprimés dans les populations provenant d'Asie alors que seulement 7 gènes sont sur-exprimés en Amérique du sud et aucun significativement sur-exprimé dans la population de laboratoire par rapport aux trois populations sensibles.

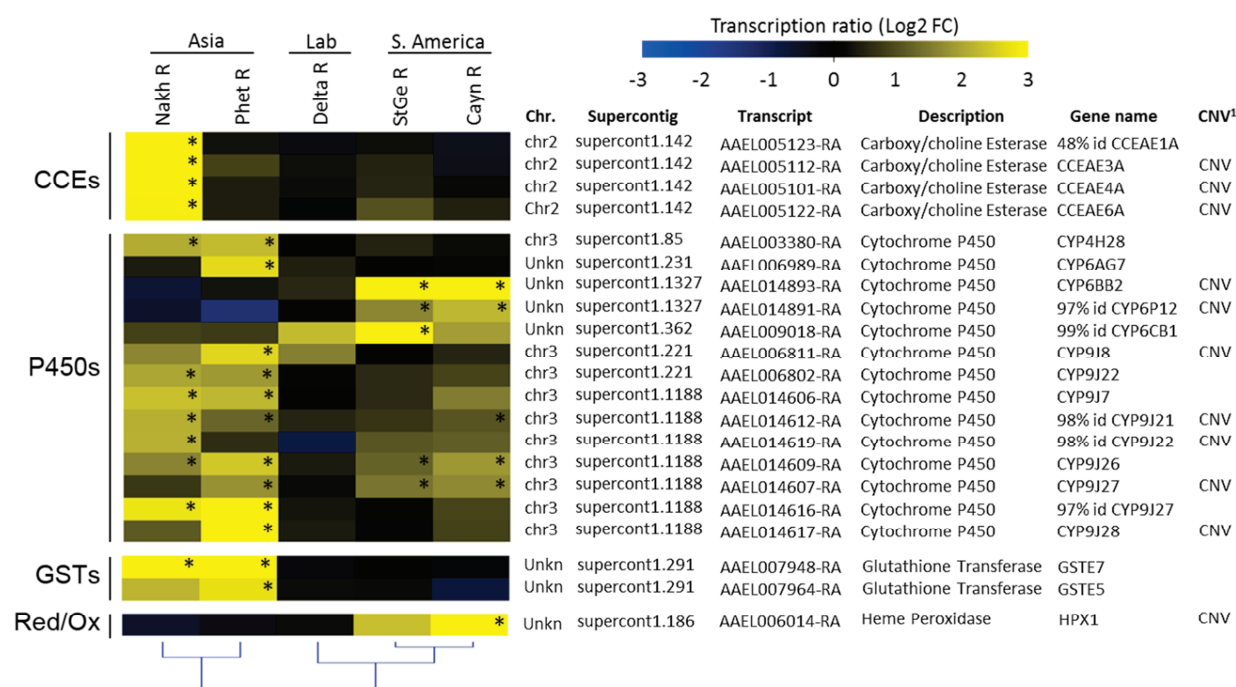


Figure 21 : Profil de transcription des gènes codant pour des enzymes de détoxification en lien avec la résistance à la deltaméthrine. L'échelle colorée correspond au log2 du rapport de transcription (fold change) entre chaque population résistante et la moyenne des 3 populations sensibles. L'analyse de clustering hiérarchique est basée sur des distances euclidiennes utilisant la méthode de corrélation de Pearson. Les notes « CNV » indiquent si le transcrit a également été trouvé affecté par une augmentation du nombre de copies géniques (résultats de la Publication II). * indique la significativité du rapport de transcription dans la population concernées (q-value<0,001).

Parmi les gènes de détoxification, 14 P450s apparaissent sur-exprimés en lien avec la résistance à la deltaméthrine, dont 9 appartiennent à la sous famille des *CYP9Js*. Parmi ces derniers, *CYP9J7*, *CYP9J8*, *AAEL0014612* (98%id *CYP9J21*), *CYP9J22*, *AAEL014616* (97% id *CYP9J27*) et *CYP9J28* sont sur-exprimés principalement dans les populations asiatiques et montrent des niveaux de sur-expression très élevés, pouvant aller jusqu'à 30 et 40 fois pour *CYP9J28* et *AAEL014616* (97% id *CYP9J27*) respectivement dans la population PhetR. Les gènes *CYP9J26* et *CYP9J27* montrent une sur-expression importante (jusqu'à 4 fois) dans les quatre populations d'Asie et d'Amérique du sud. Les autres P450s sur-exprimés en lien avec la résistance à la deltaméthrine appartiennent majoritairement à la famille des *CYP6s* avec *CYP6BB2* et *AAEL014891* (97%id *CYP6P12*) montrant une forte sur-expression dans les deux populations d'Amérique du sud par rapport aux populations sensibles. Par ailleurs, quatre gènes codant pour des estérases apparaissent fortement sur-exprimées dans la population asiatique NakhR, jusqu'à 8 fois pour *CCEAE6A* et 20 fois pour *CCEAE3A*. Parmi les GSTs, les gènes *GSTE5* et *GSTE7* sont surexprimées jusqu'à 13 fois dans les populations asiatiques par rapport aux populations sensibles. Enfin, le gène codant pour l'hème peroxidase *HPX1* apparait sur-exprimé jusqu'à 9 fois dans les populations d'Amérique du sud.

Variations de polymorphisme et gènes candidats

Plus de 749 000 substitutions ont été détectées par rapport au génome de référence d'*Ae. aegypti* (AAeg13), avec une moyenne de 300 000 SNPs par population étudiée (**Tableau 6**). Plus de 279 000 d'entre elles ont été considérées comme polymorphes entre toutes les populations (fréquence allélique variant entre 5% et 95%). Parmi elles, plus de 12 000 variations ont été considérées comme associées à la résistance (SNPs différentiels), montrant une variation de fréquence >40% entre au moins une population résistance face aux trois populations sensibles. Seulement 48% de ces SNPs différentiels sont localisés dans des gènes annotés, et 5% correspondent à des substitutions non-synonymes. A l'échelle des transcrits, un total de 3269 transcrits (1922 annotés) sont affectés par des SNPs différentiels et 804 transcrits (436 annotés) sont affectés par des SNPs différentiels non-synonymes. Par ailleurs, un maximum de 57 SNPs différentiels et 10 SNPs différentiels non-synonymes par transcrit a été observé.

	Bora S		Livp S		NwOr S		Delta R		Nakh R		Phet R		Cayn R		StGe R		Total	
	Nbr variations	%	Nbr variations	%	Nbr variations	%	Nbr variations	%	Nbr variations	%	Nbr variations	%	Nbr variations	%	Nbr variations	%	Nbr variations	%
Variations détectées vs référence	393506	100	393187	100	189369	100	317695	100	292280	100	328594	100	346445	100	294774	100	749596	100
Substitutions détectées vs référence	366043	93	364026	92,6	171692	90,7	293693	92,4	268592	91,9	304002	92,5	320715	92,6	272569	92,5	701897	93,6
Substitutions polymorphes	162192	41,2	148298	37,7	89652	47,3	142655	44,9	108977	37,3	123696	37,6	133867	38,6	127432	43,2	279742	37,3
Substitutions poly. différentielles							2430	0,8	6024	2,1	1348	0,4	2165	0,6	2049	0,7	12087	1,6
Substitutions poly. diff. non-synonymes							218	0,07	576	0,20	123	0,04	209	0,06	187	0,06	1146	0,15

Tableau 6 : Statistiques de détection des variations de polymorphismes obtenues à partir des données de RNAseq.

A l'échelle du transcriptome, 15 supercontigs présentent une forte **densité de SNPs** différentiels (>2,8 SNPs différentiels par kb de transcrit) dans au moins une région géographique étudiée (**Figure 22**). Une densité de plus de 6 SNPs différentiels par kb de séquence codante a été détectée pour les supercontigs 1.448, 1.415 et 1.1094. La plupart des catégories fonctionnelles semblent affectées à travers ces 15 supercontigs et la catégorie des gènes de détoxification apparaît fortement affectée dans le supercontig 1.371 regroupant un large cluster de P450s de la famille des CYP6s (voir publication I).

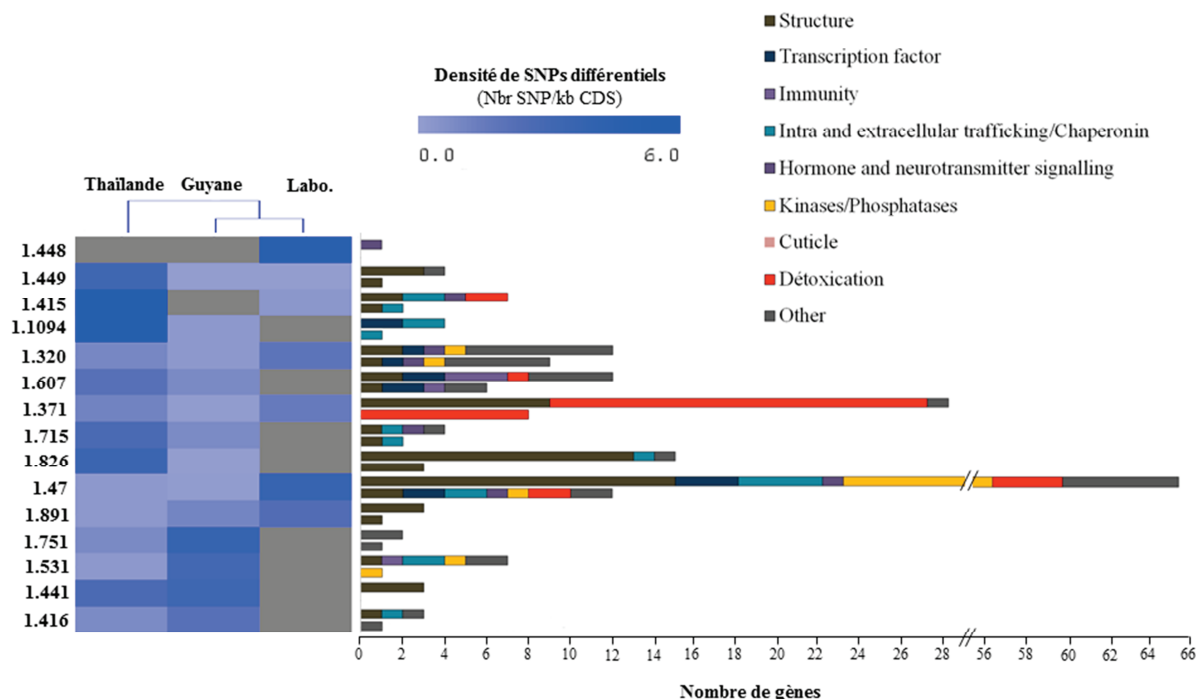


Figure 22: Empreinte de sélection à l'échelle du transcriptome. L'échelle de couleur indique la densité de SNPs différentiels par supercontig. Seuls les supercontigs montrant une densité supérieure à 2,8 SNP/kb de transcrit dans au moins une population résistante par rapport aux populations sensibles sont représentés. Pour chaque supercontig, les barres horizontales indiquent le nombre de gènes de chaque catégorie présent dans le supercontig étudié (barre du haut) ainsi que le nombre de gènes de chaque catégorie affecté par au moins un SNP différentiel (barre du bas).

A l'échelle des gènes, l'analyse des catégories fonctionnelles affectées par des variations de polymorphisme a révélé un enrichissement en SNPs différentiels de certaines catégories (**Figure 23**). Un enrichissement significatif en SNPs différentiels a ainsi été observé dans les gènes codant pour des enzymes de détoxication (2,5 fois pour les P450, 3,9 fois pour les CCEs et 1,93 fois pour les UGTs) et ceux codants pour des hormones et des neurotransmetteurs (1,3 fois). En considérant uniquement les SNPs différentiels non-synonymes, la catégorie « enzymes de détoxication » apparaît encore plus fortement enrichie (4,1 fois pour les P450, 9,5 fois pour les CCEs et 3,2 fois pour les UGTs) tandis que la catégorie « Hormones et neurotransmetteurs » est remplacée par la catégorie « immunité » (1,9 fois) et la catégorie « autres enzymes » (1,1 fois).

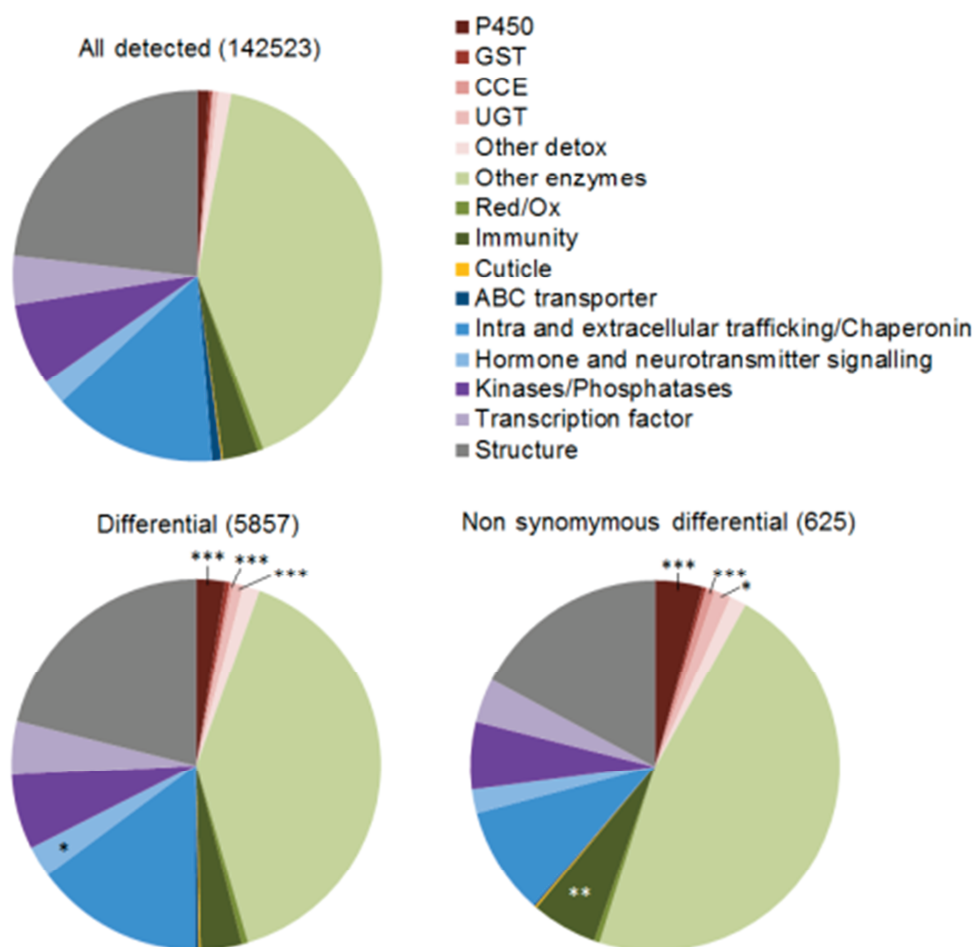


Figure 23 : Catégories fonctionnelles associées aux gènes affectés par des variations de polymorphisme en lien avec la résistance à la deltaméthrine. Les étoiles indiquent un enrichissement significatif de la catégorie concernée en terme de nombre de gènes affectés par des variations de polymorphisme (* $p > 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

Parmi les transcrits affectés par des SNPs non-synonymes, 41 appartiennent à des catégories biologiques potentiellement impliquées dans la résistance comme les enzymes de détoxification, les ABC transporteurs, les protéines cuticulaires et les protéines impliquées dans le fonctionnement du système nerveux. Ces transcrits sont affectés par un total de 69 SNPs différentiels non-synonymes (**Figure 24**). Comme précédemment, les profils de variations alléliques apparaissent différents entre les régions géographiques étudiées, mais sont généralement conservés entre population d'une même zone géographique. De plus, aucune de ces variations ne montre un profil similaire chez toutes les populations résistantes par rapport aux populations sensibles.

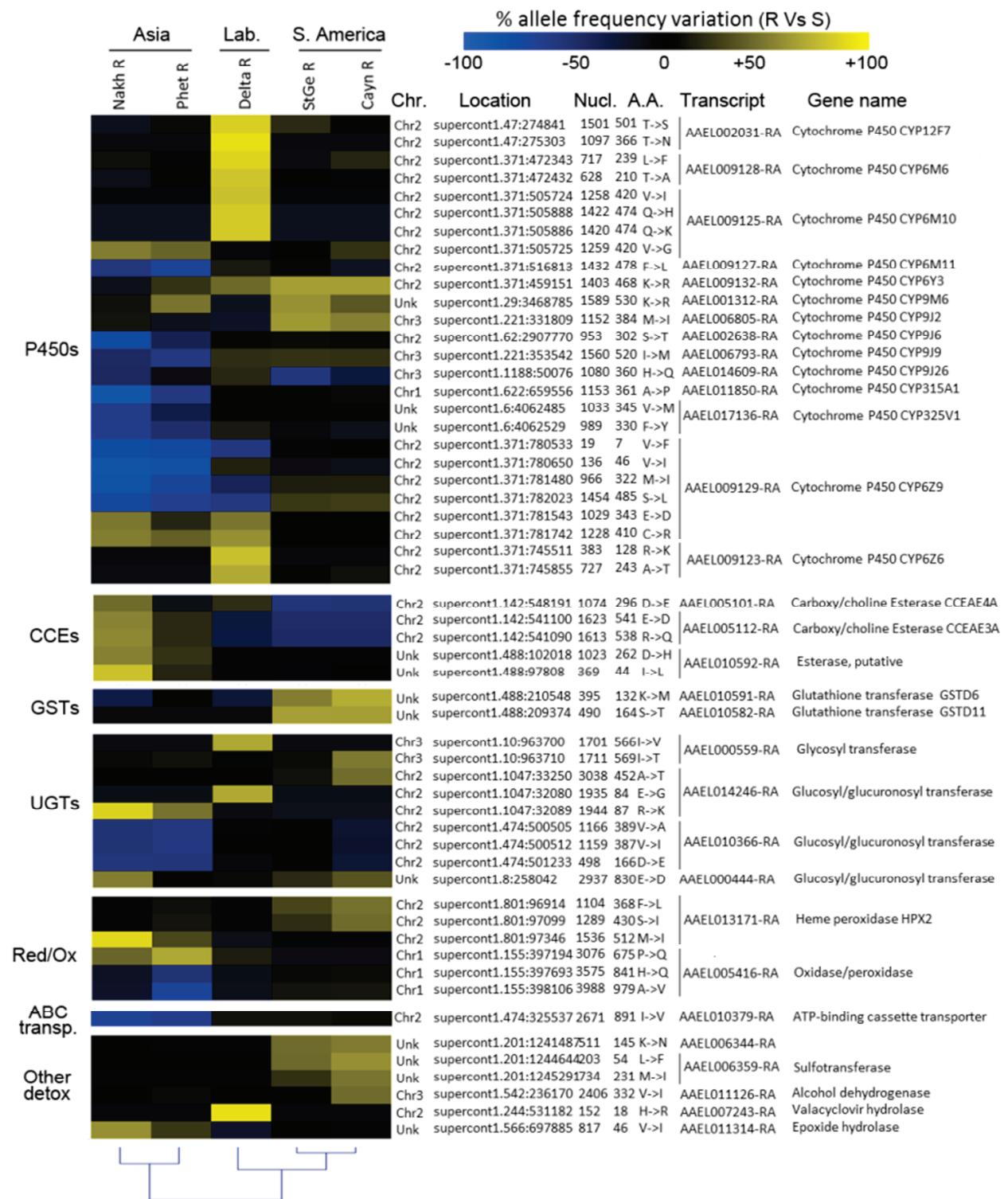


Figure 24 : Variations différentielles non-synonymes affectant des gènes potentiellement impliqués dans la résistance à la deltaméthrine. L'échelle de couleur indique un appauvrissement (bleu) ou un enrichissement (jaune) de l'allèle concerné chez les populations résistantes en comparaison des populations sensibles.

Parmi ces variations différentielles non-synonymes, 26 variations affectent 14 gènes codant pour des P450s appartenant principalement aux familles des *CYP6* et *CYP9*. Les gènes *CYP6Z6*, *CYP6M6* et *CYP6M10* sont affectés par plusieurs variations avec une forte augmentation de fréquence dans la population DeltaR par rapport aux trois populations sensibles. Une autre variation est observée pour le gène *CYP6M10* dans les deux populations asiatiques et dans la population CaynR de Guyane. Enfin, le gène *CYP6Z9* est affecté par 6 variations non-synonymes différentes dans les deux populations asiatiques dont certaines sont aussi présentes chez la population de laboratoire DeltaR. Trois gènes codant pour des estérases (*CCEAE3A*, *CCEAE4A* et *AAEL010592*) sont également affectés par des variations de polymorphisme en lien avec la résistance à la deltaméthrine. Pour *CCEAE3A* et *CCEAE4A*, l'allèle présenté est enrichi dans les populations asiatiques mais appauvri dans les populations d'Amérique du Sud. Concernant les deux GSTs, *GSTD11* et *GSTD6* sont affectées par des variations montrant une importante augmentation de fréquence dans les deux populations d'Amérique du Sud. Les UGTs *AAEL014246-RA*, *AAEL000444-RA*, *AAEL000559-RA* et *AAEL010366-RA* sont quant à elles affectées par des variations plus conservées entre populations. En ce qui concerne les autres catégories fonctionnelles, l'hème peroxydase *HPX2* est affectée par 3 variations dans les populations d'Asie et d'Amérique du sud, les 2 sulfotransférases *AAE006359* et *AAEL006344* montrent d'importantes variations de polymorphisme dans les deux populations d'Amérique du sud et enfin l'oxydase/péroxydase *AAEL005416* montre 3 variations distinctes dans les populations asiatiques.

Expression d'allèles spécifiques (Allele Specific Expression)

La comparaison des fréquences alléliques issues du RNA-seq et du DNA-seq (Publication II) a permis de détecter des événements **d'expression d'allèles spécifiques**. La **Figure 25** présente de manière ordonnée la moyenne des coefficients de corrélation \pm écart type entre les fréquences obtenues par RNA-seq et DNA-seq des différentes variations présentes au sein de chaque gène détecté par les deux approches, pour l'ensemble des populations. La majorité des gènes présentent des coefficients de corrélation élevés, soutenant l'hypothèse que les événements d'expression d'allèles spécifiques (ASE) sont occasionnels.

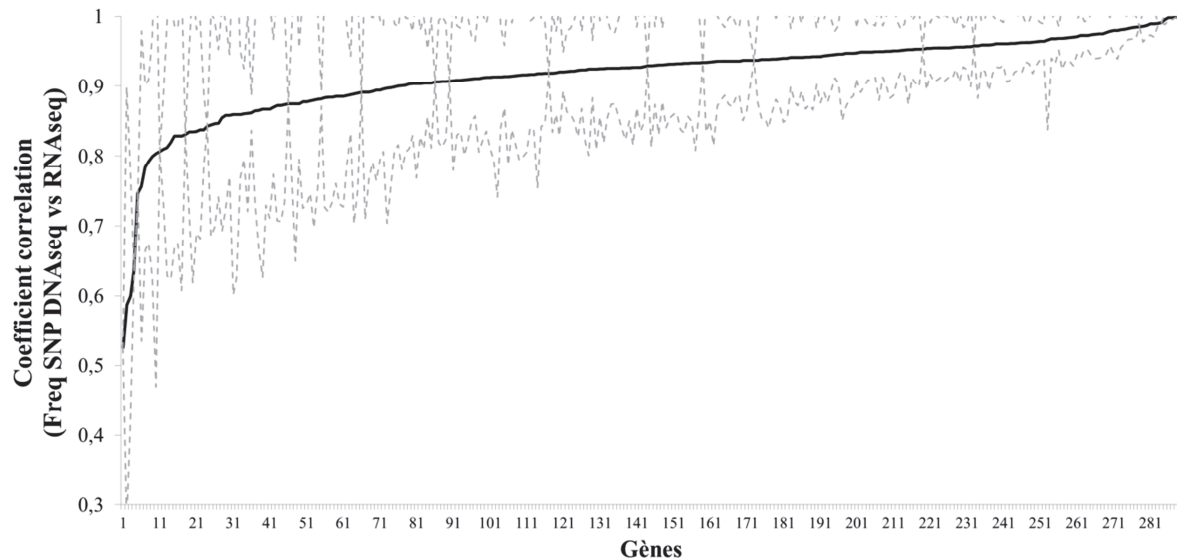


Figure 25: Distribution des coefficients de corrélation moyens par gène des fréquences alléliques obtenues par RNA-seq avec celles obtenues par DNA-seq .

Seulement 23 gènes montrent une corrélation inférieure à 0.84, représentant des gènes dont les variations de polymorphisme détectée par RNA-seq et DNA-seq ne sont pas bien corrélées, et donc des gènes potentiellement affectés par des événements d'ASE (**Figure 26**). L'écart type associé à ces corrélations moyennes est également important, montrant que pour un même gène, toutes les variations ne présentent pas de forte dissimilarité de fréquence entre RNA-seq et DNA-seq.

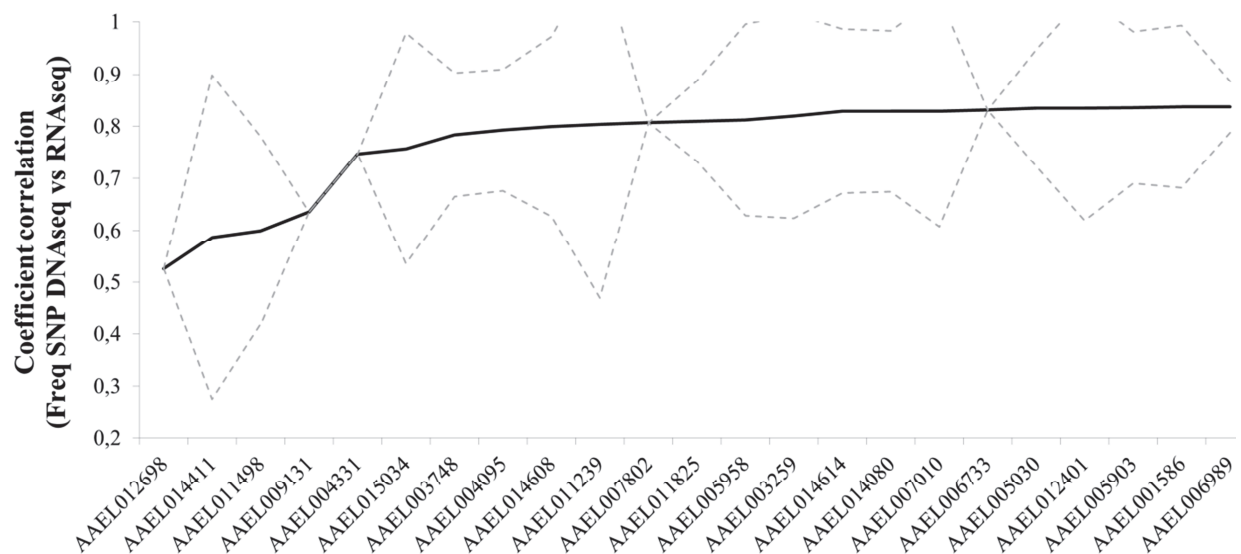


Figure 26: Distribution des coefficients de corrélation moyens sur les gènes potentiellement affectés par des événements d'expression d'allèles spécifiques.

Une étude approfondie (**Figure 27**) de ces gènes a révélé que certains de ces événements d'ASE sont présents de manière aléatoire dans les différentes populations étudiées, alors que d'autres apparaissent spécifiques d'une population. C'est par exemple le cas pour la population CaynR où l'on peut observer une diminution du coefficient de corrélation moyen pour le gène *CYP304B3*. Cette population montre ainsi une expression d'allèles spécifiques, potentiellement liée à la résistance à la deltaméthrine.

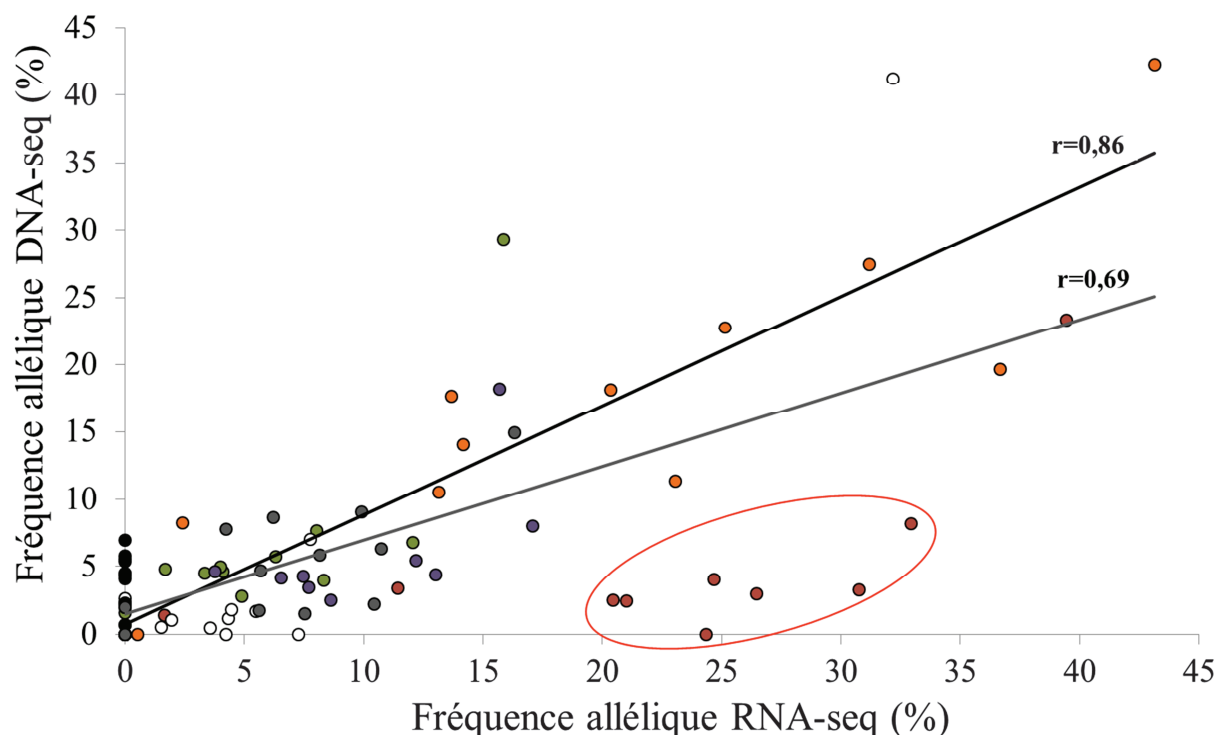


Figure 27: Focus sur l'expression d'allèles spécifiques portant sur le gène *CYP304B3*. Chaque série de couleur correspond à une des populations étudiées. Chaque point correspond à une variation. La droite grise ($r=0,69$) correspond à la corrélation sur toutes les populations alors que la noire ($r=0,86$) correspond à la corrélation sans la populations CaynR (entourée en rouge).

Rôle des amplifications géniques dans la sur-expression des enzymes de détoxification

La comparaison entre les profils d'expression des 21 gènes de détoxification sur-exprimés chez les populations résistantes et les variations du nombre de copies de ces gènes (CNVs) identifiées dans la Publication II montre dans certains cas une bonne corrélation (**Figure 28**). Ainsi, le niveau d'expression des estérases CCEAE3A, CCEAE4A et CCEAE6a et du P450 AAEL014891 (97% id CYP6P12) semble être bien expliqué par les CNVS de ces

gènes car le coefficient de corrélation est significativement très élevé et la pente proche de 1. Les corrélations entre le niveau d'expression et le CNV apparaissent également très bonne pour les P450s CYP6BB2, AAEL0014619 (98%id CYP9J22) et AAEL0014612 (98%id CYP9J21) mais avec une pente supérieure à 1, suggérant que l'augmentation du nombre de copie du gène **n'explique pas totalement** les niveaux d'expression mesurés et qu'une sur-régulation additionnelle du gène est probable. Enfin, la sur-expression des 14 autres gènes ne semble pas avoir de lien significatif avec des phénomènes d'amplification géniques suggérant que **d'autres mécanismes de régulation** sont impliqués.

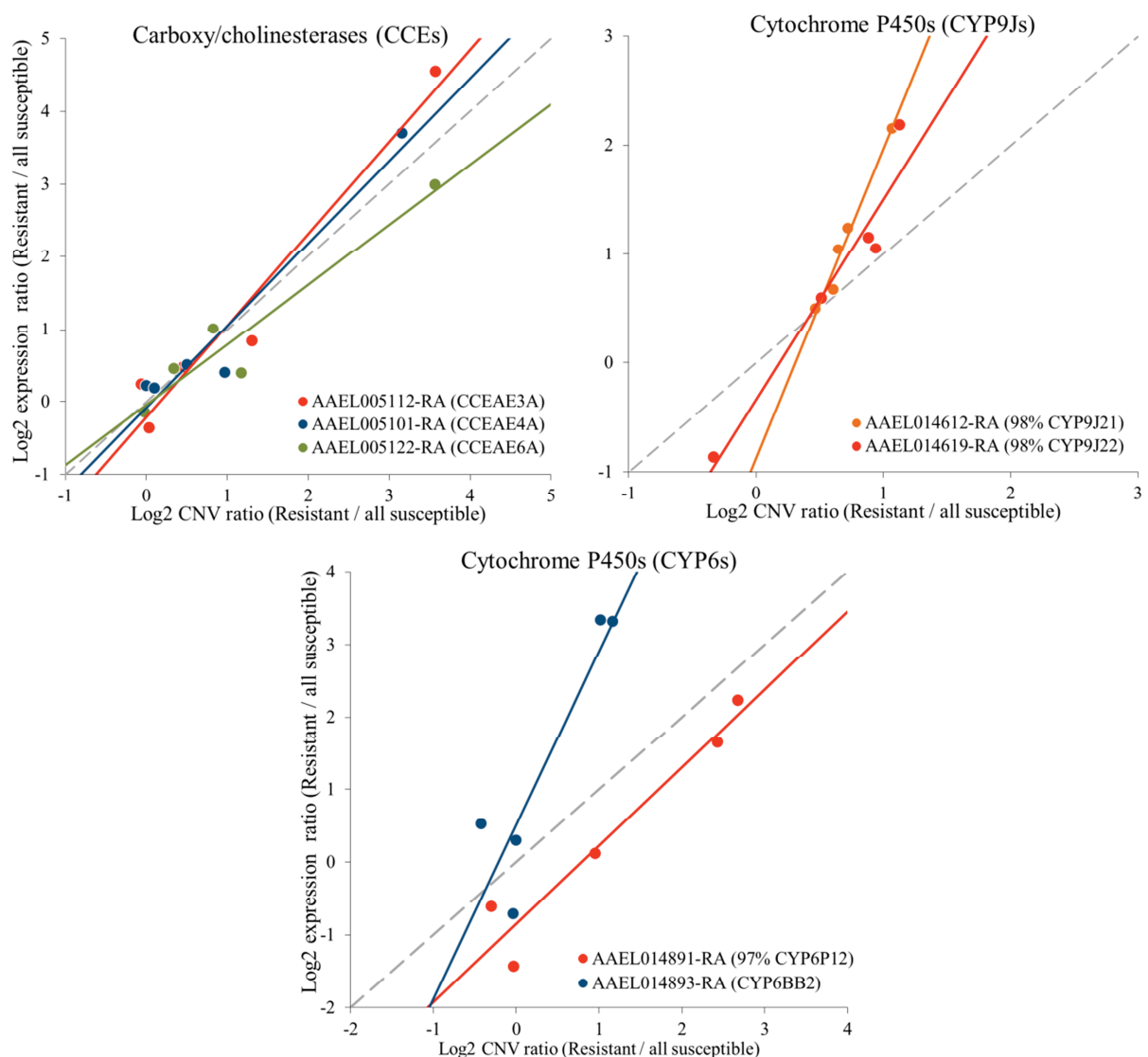


Figure 28: Lien entre augmentation du nombre de copies et sur-expression des gènes candidats. Le trait pointillé représente une corrélation de pente 1.

Modifications cis-promotrices et expression des gènes de détoxication

Parmi les 8247 variations détectées dans les régions promotrices des gènes ciblés, 189 sont localisées en amont de gènes sur-exprimés dans au moins une population résistante. Seulement 21 d'entre elles montrent une bonne corrélation entre leur fréquences alléliques et le niveau d'expression du gène en aval. La **Figure 29** présente cette corrélation pour les gènes *CYP9J26* et *AAEL014891* (97% id *CYP6P12*), montrant une corrélation positive pour *CYP9J26* et négative pour *AAEL014891* (97% id *CYP6P12*).

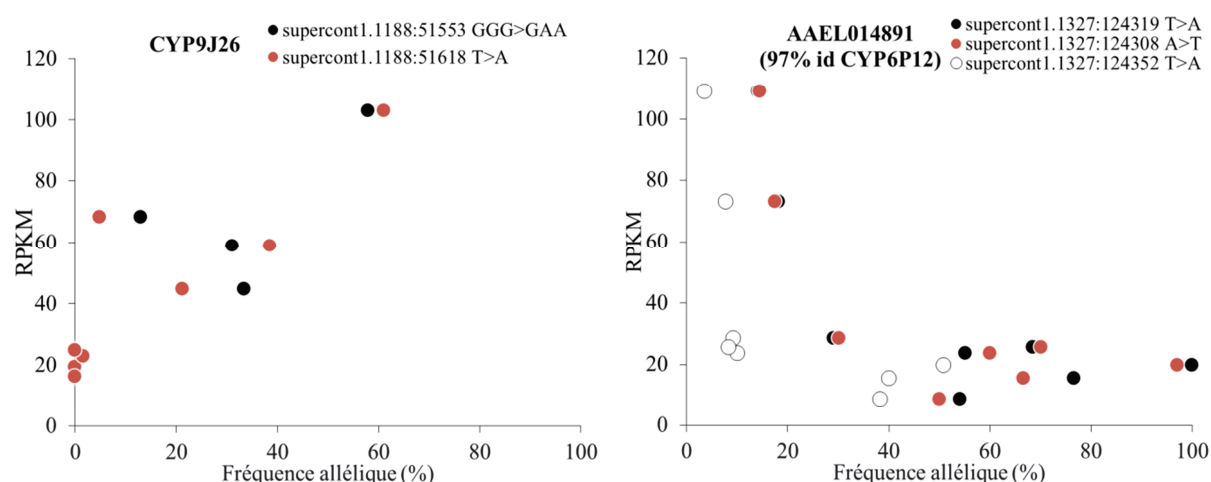


Figure 29: Association entre la fréquence des variations de polymorphisme de la région *cis*-régulatrice des gènes *CYP9J26* et *AAEL014891* et le niveau d'expression de ces gènes (RPKM).

De nombreux éléments de régulations sont affectés par ces variations de polymorphisme dans les régions promotrices des gènes *CYP9J26* (**Figure 30 a.**) et *AAEL014891* (97% id *CYP6P12*) (**Figure 30 b.**). Ces éléments sont considérés comme détectés lorsqu'ils présentent plus de 95% de similarité avec la matrice de composition correspondante (base de données Transfac). Les variations de polymorphisme observées dans ces éléments en lien avec l'expression des gènes font varier cette similarité, faisant ainsi apparaître, changer ou disparaître certains éléments régulateurs. Concernant la région promotrice de *CYP9J26*, les éléments POU1F1a, COE1 et STAT4 présentent plus de 5% de dissimilarité par rapport à leur matrice consensus dans la séquence variante « résistante » par rapport à la séquence de référence, et les éléments POU2F1, HNF-1C, Nkx6-2 et RXR-alpha y apparaissent avec moins de 5% de dissimilarité. Dans le cas de *AAEL014891*, beaucoup d'éléments sont affectés avec HNF-1A, HNF-1B, DPB, CRX, POU2F1, Tll, HFN-3Beta, FOXP3 et Nkx6-2 qui deviennent trop différents des motifs renseignés dans les bases de

données et inversement les motifs de HNF-1C, HNF-3Beta, T3R-beta 1, C/EPB beta et Hb se retrouvent très similaires (<5%) à leur séquence consensus.

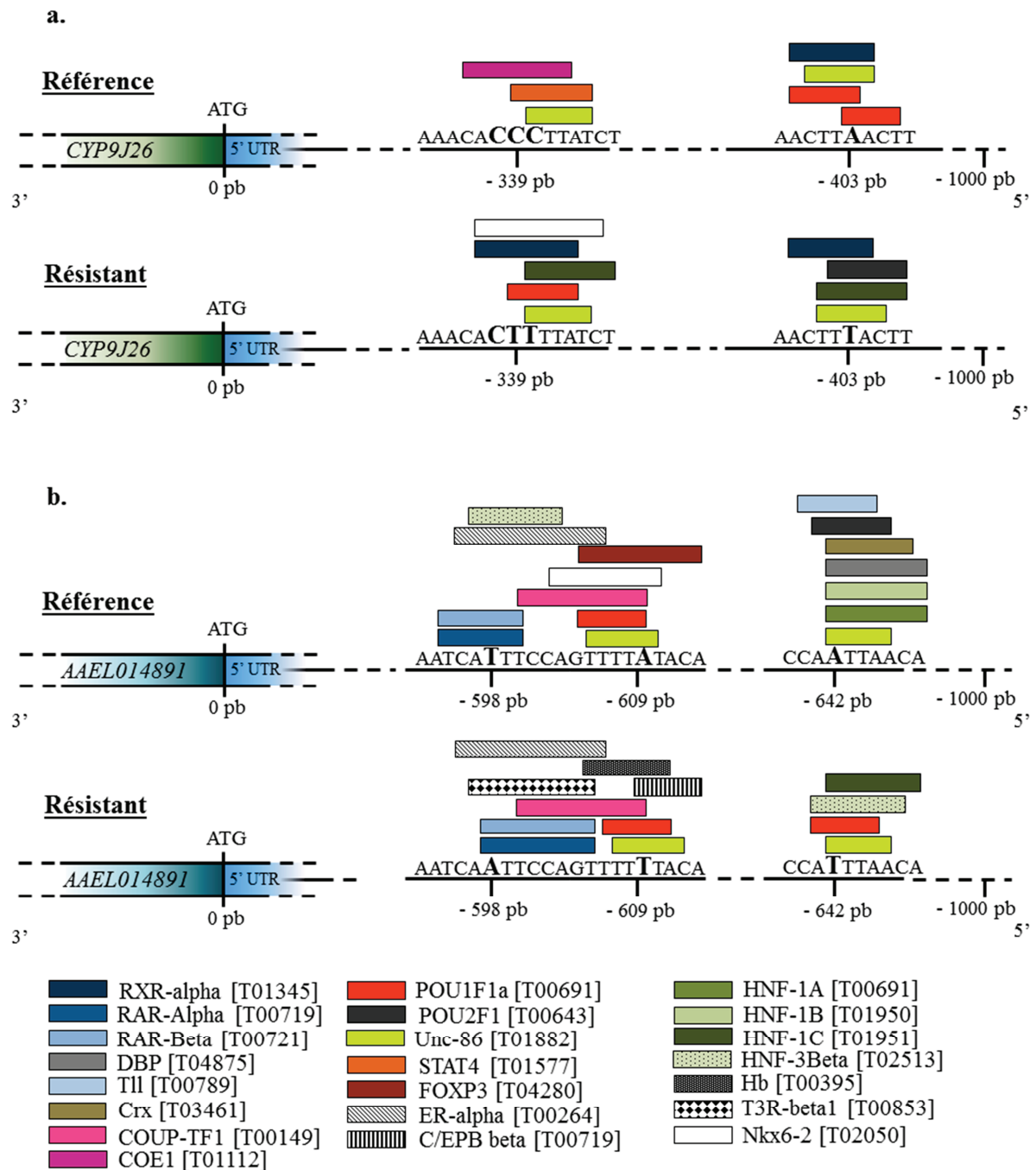


Figure 30: Eléments de régulation des gènes a. *CYP6J26* et b. *AAEL014891* affectés par les variations de polymorphismes potentiellement liés à la sur-expression du gène chez les populations résistantes. Les noms des éléments présents dans la légende correspondent aux termes utilisés dans la base de données Transfac 8.3.

IV. Discussion

Combiner RNA-seq et DNA-seq pour étudier la résistance des moustiques aux insecticides

Cette étude combine de manière originale des données d'expression et de polymorphisme issus d'une analyse RNA-seq avec des données de CNV et de polymorphisme issues d'une analyse DNA-seq. Cette combinaison d'approche a permis d'appréhender pour la première fois de manière globale les **mécanismes génétiques** associés à la **sur-expression** des gènes de détoxification associés à la résistance aux insecticides chez *Ae. Aegypti*. L'analyse RNA-seq a permis de détecter plus de 80% des transcrits annotés chez *Ae. aegypti* et les niveaux d'expression de ces transcrits ont ainsi été quantifiés. Concernant les variations de polymorphisme détectées dans cette étude, seulement 5378 sont communes avec l'approche DNA-seq décrite dans le chapitre précédent, probablement à cause des différences importantes de couverture de séquençage selon les gènes entre les deux techniques. En effet, les gènes candidats à la résistance aux insecticides sont souvent faiblement exprimés ce qui réduit d'autant plus la couverture de séquençage sur ces gènes en RNA-seq. Néanmoins, la bonne corrélation globale entre les fréquences alléliques déterminées par les deux approches suggère une bonne estimation générale des fréquences alléliques par le RNA-seq. Il a toutefois été observé quelques événements potentiels d'expression d'allèles spécifique (ASE), biaisant ainsi de façon ponctuelle les fréquences alléliques obtenues à partir des données de RNA-seq. Dans certains cas, ces événements sont associés à une population particulière, apparaissant ainsi en lien potentiel avec l'expression d'un allèle associé à la résistance.

Catégories fonctionnelles affectées par la sélection et gènes candidats

A travers les gènes candidats détectés par l'analyse des rapports d'expression ou des variations de polymorphisme, les CCEs et les P450s sont les catégories fonctionnelles les plus impactées. Concernant les CCEs, *CCEAE3A* et *CCEAE4A* sont affectés par de forts niveaux de sur-expression et de nombreuses variations de polymorphisme non-synonymes dans les populations résistantes asiatiques par rapports aux populations sensibles. Ces deux estérases ont été décrites dans la littérature dans le cadre de la résistance à l'OP téméphos (Grigoraki et al. 2015; Poupardin et al. 2014), mais des mutations ponctuelles d'un de leur orthologue chez *Lucilia cuprina* ont également été associées à la métabolisation des PYRs (Heidari et al. 2005; Devonshire et al. 2007; Coppin et al. 2012). Plusieurs des variations observées pour ces CCEs en Asie montrent toutefois des fréquences alléliques opposées dans les populations

d'Amérique du Sud, suggérant des phénotypes de **résistance multiple** aux PYRs et aux OPs. Dans ce cadre, il apparaît difficile, par simple phénotypage, d'élucider le rôle précis de ces estérases dans la résistance à ces deux familles d'insecticides.

Les P450s de la famille des *CYP6s* et des *CYP9s* sont les plus affectés par des sur-expressions et des variations de polymorphisme en lien avec la résistance. Les *CYP9Js* sont principalement affectés par des sur-expressions, certains d'entre eux étant spécifiques d'une région géographique tandis que d'autres sont représentés dans plusieurs populations d'origine différente. Plusieurs d'entre eux comme *CYP6J26* et *CYP9J28* ont déjà été associés à la résistance aux PYRS (Strode et al. 2008; Saavedra-Rodriguez et al. 2012; David et al. 2013; Faucon et al. 2015) et décrits comme capables de dégrader les PYRS (Stevenson et al. 2012). D'autres gènes très proches comme *CYP9J27* et *AAEL014616* (97% id *CYP9J27*) apparaissent aussi comme de bons candidats. Les *CYP6Zs* sont principalement sous-exprimés et fortement affectés par des variations de polymorphisme. Étonnamment, ils ont été associés à la résistance aux PYRS par leur sur-expression et ont été montré capable d'agir sur les métabolites des PYRs après hydrolyse par des estérases (David et al. 2013; Chandor-Proust et al. 2013) ce qui est en opposition avec nos résultats et qui démontre que les facteurs favorisant la sélection de certaines enzymes impliquées dans la résistance dépendent de l'histoire évolutive de la population (Georghiou et Taylor 1986; Rosenheim et Tabashnik 1990). Parmi les autres sous familles de *CYP6s*, *CYP6BB2* et *AAEL014891* (97% id *CYP6P12*) sont sur-exprimés et amplifiés en Amérique du sud. *CYP6BB2* a déjà été impliqué dans la résistance au néonicotinoïde imidaclopride (Riaz et al. 2013) et a également été montré comme capable de dégrader le PYR perméthrine (Kasai et al. 2014). Les orthologues de *CYP6P12* comme *CYP6P9* d'*An. funestus* ont aussi été impliqués dans la résistance aux PYRs (Matambo et al. 2010) et *CYP6P3* d'*An. gambiae* à la résistance au bendiocarb et aux PYRs (Edi et al. 2014).

Concernant les autres familles de gènes, *GSTE5* et *GSTE7* sont fortement sur-exprimés dans les populations résistantes à la deltaméthrine d'Asie et *GSTD6* et *GSTD11* sont affectés par des variations de polymorphisme significatives en Amérique du Sud. Les GSTEs sont fréquemment associées à la résistance aux insecticides (Che-mendoza et al. 2009) et *GSTE2* a été associé à la résistance au DDT et aux PYRS et une modification ponctuelle d'acide aminé a récemment été décrite comme conférant la capacité de métabolisation du DDT dans une population résistance d'*An. funestus* (Riveron et al. 2014). Enfin, les hème peroxydases *HPX1* et *HPX2* montrent respectivement un profil d'expression et de variation de polymorphisme intéressants. A notre connaissance, aucune étude ne traite des hème

peroxydases comme candidats à la résistance aux insecticides, mais elles pourraient être impliquées dans la gestion du stress oxydant généré par les PYRs (Vontas et al. 2001). HPX1 apparaît également amplifiée en association avec sa sur-expression dans des populations résistantes *d'Ae aegypti* à la deltaméthrine (Chapitre III, Publication II).

Aucune mutation *Kdr* n'a été détectée par RNA-seq contrairement au DNaseq, à cause du très faible niveau d'expression des gènes codant pour les canaux sodium voltage dépendants. Un gène codant pour un canal à ions chlorure semble être affecté par des variations de polymorphisme en lien avec le phénotype de résistance à la deltaméthrine. Les cibles des insecticides ne sont parfois pas toutes connues, et il existe des cibles secondaires. C'est notamment le cas des canaux à ions chlorure qui, à l'image des canaux sodium voltage dépendants, sont affectés par les PYRS (Breckenridge et al. 2009). Ainsi, les variations trouvées dans ce canal à ion chlorure représentent potentiellement des marqueurs de la résistance aux PYRs à l'instar des mutations *Kdr*.

Modification génomiques entraînant la sur-expression

L'expression des gènes candidats apparaît parfois très bien corrélée avec le nombre de copies de ces gènes, comme pour *CCEAE3A*, *CCEAE4A* et *CCEAE6A*. Les variations du nombre de copies d'un gène semblent alors être le mécanisme principal de sur-expression de certains gènes candidats à la résistance. Néanmoins, d'autres mécanismes de régulation semblent parfois responsables de la sur-expression de ces gènes, comme par exemple pour *CYP6BB2*, *AAEL0014619* (98%id *CYP9J22*) et *AAEL0014612* (98%id *CYP9J21*). Par ailleurs, même si *CYP9J8*, *CYP9J27* et *CYP9J28* apparaissent sur exprimés et présentent plusieurs copies géniques dans les populations résistantes, la corrélation entre ces deux variables n'est pas significative. Dans ce cas, **d'autres mécanismes de régulations** impactent probablement le niveau d'expression de ces gènes. Enfin, d'autres gènes sur-exprimés ne montrent simplement aucune augmentation du nombre de copies. L'importance des éléments **cis- et/ou trans- régulateurs** est ainsi mise en évidence, et des modifications de tels éléments en lien avec la sur-expression de gènes candidats à la résistance ont été recherchées. La recherche de modifications des éléments *cis* –régulateurs des régions promotrices (1kb en amont) des gènes sur-exprimés a révélé de nombreux changements dans les éléments régulateurs potentiels. Ces éléments ont été détectés en recherchant dans des bases de données du règne animal, toutes espèces confondues, car très peu sont documentées chez les insectes. Parmi tous ces éléments, seul l'élément FOXP3 semble intéressant car il est décrit comme étant un répresseur de l'expression du gène qu'il régule (Schubert et al. 2001), et sa

disparition chez le variant résistant pourrait engendrer une expression constitutive accrue du gène *AAEL014891*. Par ailleurs, même si ils ne permettent qu'une meilleure induction de l'expression, quelques éléments paraissent toutefois intéressants en regard de la résistance aux insecticides : RXR-Alpha a été décrit comme étant impliqué dans la régulation des P450s en réponse aux xénobiotiques chez l'Homme (Cai et al. 2002) ou encore dans la régulation des P450 et des enzymes de phase II comme les GST chez la souris (Wu et al. 2004) ; RAR-Alpha est impliqué dans la réponse du système de détoxification aux xénobiotiques (Wallace et Redinbo 2013). Enfin, plusieurs sur-expressions ne sont expliquées ni par des augmentations du nombre de copies ni par des modifications des éléments *cis*-régulateurs proches (<1 kb), suggérant la présence d'un élément ***cis- plus distant*** ou bien de facteurs ***trans-régulateurs***. De tels éléments *trans*- ont été reliés à la sur-expression de P450s associée à la résistance de *M. domestica* et *D. melanogaster* aux PYRs et au DDT (Liu et Scott 1996; Maitra et al. 2000, 2002) mais également à la sur-expression d'une GST dans une population d'*Ae. aegypti* mutants (Grant et Hammock 1992). Plus récemment le rôle des GPCRs²¹ et des gènes reliés aux GPCRs a été mis en évidence dans la régulation de gènes impliqués dans la résistance d'*Ae. aegypti* au PYRS (Li et al. 2014). De manière intéressante, une GPCR apparaît sur-exprimé près de 10 fois en lien avec la résistance à la deltaméthrine en Thaïlande.

Conclusion

Plusieurs gènes candidats apparaissent fortement sur-exprimés chez les populations résistantes à la deltaméthrine. D'importantes variations de polymorphisme ont également été mises en évidence, affectant parfois les gènes sur-exprimés. L'augmentation du nombre de copies de ces gènes apparaît également comme un mécanisme efficace entraînant la sur-expression. Des mécanismes additifs comme les modifications des éléments *cis/trans* régulateurs semblent également présent, s'ajoutant parfois aux CNVs, afin d'expliquer le niveau d'expression de certains gènes candidats. Parmi les éléments *cis*-régulateurs étudiés, des variations intéressantes ont été détectés dans des éléments connus, sans toutefois nous permettre de valider leur rôle dans la sur-expression des gènes candidats.

Par ailleurs, les profils d'expression ainsi que les variations de polymorphisme des séquences codantes et des régions promotrices apparaissent rarement conservés entre les différentes régions du monde. Ces résultats confirment ceux de la Publication II, montrant que les marqueurs génétiques sous-jacents à la résistance métabolique ne sont pas universels.

²¹ « G protein-coupled receptors », récepteur couplé aux protéines G qui perçoivent des signaux extracellulaires et activent le signal de transduction, commandant des cascades de signaux secondaires.

Chapitre V :

Discussion et perspectives

I. Le contexte en bref

A l'heure actuelle, le moustique est qualifié par l'OMS comme l'animal de plus **dangereux** au monde, tuant des millions de personnes chaque année par le biais des **maladies** qu'il transmet (Morrison 2014; Rougeron et al. 2015; Wilson et Chen 2015). Ces maladies graves comme le paludisme, la dengue et le chikungunya ne font l'objet d'**aucun traitement** préventif fiable, et le meilleur moyen de limiter les épidémies liées à ces maladies est de limiter les populations de moustiques vectrices (Hemingway et al. 2006). Des campagnes de **lutte anti-vectorielle** (LAV) basées sur l'utilisation d'insecticides ont ainsi été mises en place dans les pays à risques. Ces pays étant en majorité des pays sous-développés ou en développement, l'utilisation d'insecticides chimiques reste majoritaire du fait de leur efficacité, de leur facilité d'utilisation ainsi que de leur faible coût. Ces méthodes de LAV sont utilisées depuis des décennies, et des phénomènes de **résistance** des populations de moustique sont observés dans le monde entier et ce à toutes les classes d'insecticides chimiques disponibles (Hemingway et al. 2002). Face à ce constat alarmant et à la persistance des maladies vectorielles, il apparaît essentiel de gérer ces résistances pour garantir l'efficacité des insecticides disponibles en attendant la mise sur le marché de nouveaux insecticides, de stratégies de contrôle alternatives ou de traitements médicaux efficaces. Dans ce cadre, la compréhension des mécanismes de résistance est une étape essentielle. Les principales approches aujourd'hui appliquées au suivi de la résistance aux insecticides intègrent le suivi des niveaux de résistances déterminés par bioessais ainsi que le suivi de l'évolution des fréquences des différentes mutations de cible (*Kdr*, *Ace*...). Néanmoins, ces seuls marqueurs moléculaires ne permettent d'appréhender qu'une partie des mécanismes de résistance, sans par exemple tenir compte de la **résistance métabolique**.

Dans ce contexte, le but de ma thèse a été d'identifier de nouveaux marqueurs génomiques de la résistance, et de consolider les connaissances déjà accumulées sur les mécanismes de résistance chez les moustiques. L'effort a été principalement concentré sur la résistance métabolique du moustique *Ae. aegypti* aux pyréthrinoïdes. Ces travaux de recherche ont été organisés autour de deux axes principaux afin de (1) évaluer la pertinence de

l'utilisation des nouvelles **techniques de séquençage** à haut débit dans l'étude des mécanismes de résistance des moustiques aux insecticides, et (2) identifier de **nouveaux marqueurs** génomiques liés à la résistance.

II. Bilan de la thèse

Le séquençage haut-débit pour l'étude des mécanismes de résistance des moustiques aux insecticides

L'arrivée des nouvelles techniques de séquençage à haut débit et la diminution de leur coût d'application en ont rapidement fait un outil d'intérêt pour la recherche en biologie. Les efforts simultanés réalisés en bio-informatique ont permis le développement d'outils accessibles pour l'analyse des données générées par le séquençage haut débit. L'équipe de recherche du LECA dans laquelle j'ai réalisé ma thèse s'est rapidement intéressée à ces outils comme moyen d'étude des mécanismes moléculaires de la résistance du moustique aux insecticides. Une première étude pilote de RNA-seq a ainsi été lancée avec succès, montrant **la puissance du séquençage au débit** dans la caractérisation de ces mécanismes de résistance. Le génome de plusieurs espèces de moustiques d'intérêt sanitaire étant séquencé et disponible, le RNA-seq a permis une détection efficace et fiable des gènes candidats à la résistance ainsi la possibilité d'étudier les variations de polymorphisme potentiellement impliquées dans la résistance. Globalement, la réponse adaptative des moustiques aux insecticides pyréthrinoïdes semble faire intervenir des mécanismes de sur-expression de gènes codant pour des enzymes de détoxification conjointement à la sélection de variants alléliques. Les populations séquencées dans cette étude pilote ayant été sélectionnées au laboratoire et montrant de faibles niveaux de résistance, le travail ultérieur a ensuite porté sur des populations naturelles d'origines variées et montrant des niveaux de résistance plus élevés. De plus, les contraintes d'utilisation des marqueurs ARN pour le suivi des mécanismes de résistance nous a amené à focaliser nos recherches sur l'identification de marqueurs génomiques plus facilement utilisables à grande échelle.

L'effort de recherche s'est concentré sur la résistance du moustique vecteur de la dengue *Ae. aegypti* à l'insecticide pyréthrinoïde **deltaméthrine**, molécule actuellement largement utilisée en LAV. Le séquençage de régions génomiques d'intérêts (DNA-seq SureSelect®) ainsi que du transcriptome (RNA-seq) de populations de moustiques sensibles et résistantes **d'origines géographiques variées** a été effectué. La combinaison de ces deux

techniques a permis d'identifier et de caractériser de manière fine les marqueurs moléculaires impliqués dans les phénomènes de résistance d'*Ae. aegypti* à la deltaméthrine.

Marqueurs génomiques de la résistance

Résistance métabolique à la deltaméthrine

Concernant la résistance métabolique, les gènes sur-exprimés ainsi que les modifications génomiques (CNVs et SNPs) en lien avec le phénotype de résistance sont le plus souvent **spécifiques d'une région** et rarement conservés à l'échelle du globe (rarement universels). La sélection de variants alléliques apparaît également être un mécanisme fréquent de réponse à la sélection aux PYRs. Théoriquement, ce mécanisme peut permettre la sélection de variants enzymatiques présentant une meilleure affinité pour les molécules insecticides, augmentant ainsi leur potentiel de bio-dégradation ou leur capacité de séquestration. Toute modification constitutive et héritée du transcriptome est due à une cause génomique. Ainsi, des événements d'amplifications géniques ainsi que des variations de séquences *cis*-promotrices ont été détectées en association avec la sur-expression de nombreux gènes candidats. Tandis que **l'amplification génique** explique parfois à elle seule la sur-expression d'un gène de résistance, des modifications de promoteurs potentiellement impliqués dans la régulation de ces gènes ont aussi été détectées. Toutefois, les facteurs génomiques liés à la sur-expression de certains gènes n'ont pu être identifiés. Une **régulation** de ces gènes par des éléments *cis*- localisés plus en amont ou bien des éléments *trans*- peut alors être envisagée.

Globalement, ces mécanismes de résistance aux PYRs affectent de nombreux **gènes candidats**. Néanmoins la plupart impactent des enzymes de détoxification, et plus particulièrement quelques familles de P450, de CCEs et de GSTs. Ces gènes candidats représentent vraisemblablement de bons marqueurs de résistance et sont résumés dans le **Tableau 7**. Les plus pertinents vis-à-vis de la résistance à la deltaméthrine sont les P450s et les GSTs fortement sur-exprimés, souvent affectés par des CNVs et/ou par des mutations non-synonymes comme CYP6BB2, AAEL014891, CYP9J26, CYP9J27, AAEL014616, CYP9J28, GSTE5 et GSTE7. Plusieurs d'entre eux (ou des homologues proches) ont également été validés comme capable de dégrader les PYRs. Encore méconnues mais fortement sur-exprimées et affectées par de nombreuses mutations non-synonymes, les hème peroxidases HPX1 et HPX2 sont potentiellement impliquées dans la gestion du stress oxydatif induit par les PYRs (Vontas et al. 2001) et représentent ainsi de bons marqueurs de résistance.

	Résistance à la Deltaméthrine (résultats de la thèse) - <i>Ae.aegypti</i>							Résistances dans la littérature - <i>Ae. Aegypti</i>			Homologues validés (association génétique ou métabolisation)			
Cat.	ID Gène	ID Transcrit	Nom Gène	Sur-exprimé (ratio max)	CNV (ratio max)	Variations de polymorphisme	Modification de Promoteur	Statut	Insecticide concerné	Ref.	Gène	Espèces	Insecticide	Ref.
CCE	AAEL005112	AAEL005112-RA	CCEAE3A	Oui (22)	Oui (15)	R538Q; E541D		Décrit	Delta et/ou Tem	Marcombe et al., 2012	CCEAE3A	<i>Ae. albopictus</i>	Tem	Grigoriaki et al., 2015
								Décrit	Tem	Poupardin et al., 2014				
	AAEL005101	AAEL005101-RA	CCEAE4A	Oui (13)	Oui (11)	D296E								
	AAEL005122	AAEL005122-RA	CCEAE6A	Oui (8)	Oui (15)	Non		Décrit	Tem	Poupardin et al., 2014	CCEAE6A	<i>Ae. albopictus</i>	Tem	Grigoriaki et al., 2015
	AAEL005123	AAEL005123-RA		Oui (18)	Non	Non								
	AAEL010592	AAEL010592-RA		Non	Non	I44L; D262H								
P450	AAEL014893	AAEL014893-RA	CYP6BB2	Oui (8)	Oui (2)	Non		Décrit	Tem et Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2014				
								Décrit	Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2008				
								Validé	Perm	Kasai et al 2014				
	AAEL014891	AAEL014891-RA	97%id CYP6P12	Oui (4)	Oui (7)	Non	1.1327:124319 T>A; 1.1327:124308 A>T; 1.1327:124352 T>A	Décrit	Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2008	CYP6P3	<i>An. gambiae</i>	Delta et Perm	Muller et al., 2008
	AAEL014606	AAEL014606-RA	CYP9J7	Oui (5)	Non	Non								
	AAEL006811	AAEL006811-RA	CYP9J8	Oui (6)	Oui (2)	Non		Décrit (ss-exprimé)	Perm	Strode et al., 2008				
	AAEL006802	AAEL006802-RA	CYP9J22	Oui (4)	Non	Non		Décrit	Delta et/ou Tem	Marcombe et al., 2012				
								Décrit	Tem et Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2014				
	AAEL014619	AAEL014619-RA	98% id CYP9J22	Oui (4)	Oui (2)	Non	1.1188:102112 A>G	Décrit	Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2012				
	AAEL014609	AAEL014609-RA	CYP9J26	Oui (5)	Non	H360Q	1.1188:51553-51555 GGG>GAA; 1.1188:51618 T>A	Décrit	Perm	Strode et al., 2008				
								Décrit	Tem	Saavedra-Rodriguez et al., 2014				
								Validé	Delta et Perm	Stevenson et al., 2012				
	AAEL014607	AAEL014607-RA	CYP9J27	Oui (4)	Oui (2)	Non	1.1188:184948 T>G; 1.1188:184996 T>C	Décrit	Perm	Strode et al., 2008				
	AAEL014616	AAEL014616-RA	97% id CYP9J27	Oui (44)	Non	Non								
GST	AAEL014617	AAEL014617-RA	CYP9J28	Oui (30)	Oui (2)	Non		Décrit		Strode et al., 2008;				
								Décrit	Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2012				
								Validé	Delta	Stevenson et al., 2012				
	AAEL009018	AAEL009018-RA	99%id CYP6CB1	Oui(24)	Non		1.362:641230 T>G; 1.362:641229-641231 GTT>GGC; 1.362:641233 A>G; 1.362:641398-641400 CGA>CAG; 1.362:641628 G>A; 1.362:641415 G>A; 1.362:641617-641617 T>A	Décrit	Perm	Strode et al., 2008				
								Réfuté	Delta et Perm	Stevenson et al., 2012				
	AAEL014612	AAEL014612-RA	98%id CYP9J21	Oui (4)	Oui(2)		1.1188:107692 T>G							
	AAEL007964	AAEL007964-RA	GSTE5	Oui (13)	Non	Non	1.291:927135 G>A; 1.291:927181 T>A; 1.291:927170 T>C; 1.291:927058 T>A; 1.291:926572 T>A; 1.291:926622 A>G	Validé	DDT	Lumjuan et al, 2011	GSTE2	<i>An. gambiae</i> <i>An. funestus</i>	DDT	Ortelli et al., 2003; Riveron et al., 2014
	AAEL007948	AAEL007948-RA	GSTE7	Oui (6)	Non	Non	1.291:928851 T>C	Décrit	Perm	Strode et al., 2008	GSTE2	<i>An. gambiae</i> <i>An. funestus</i>	DDT	Ortelli et al., 2003; Riveron et al., 2014
								Décrit	Delta et/ou Tem	Marcombe et al., 2012				
								Décrit	Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2008				
								Décrit	Tem et Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2014				
	AAEL010591	AAEL010591-RA	GSTD6	Non	Non	K132M		Validé	Delta	Lumjuan et al, 2011				
HPX	AAEL010582	AAEL010582-RA	GSTD11	Non	Non	S164T								
	AAEL006014	AAEL006014-RA	HPX1	Oui (9)	Non	Non		Décrit	Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2012				
	AAEL013171	AAEL013171-RA	HPX2	Non	Non	F368L;S430I;M512I		Décrit	Perm	Saavedra-Rodriguez et al., 2012				

Tableau 7 : Récapitulatif des meilleurs gènes candidats issus de la thèse et identifiés dans la littérature. Delta = Deltaméthrine, Perm = Pemréthrine et Tem = Téméphos.

Néanmoins, ces marqueurs génomiques n'apparaissent que très rarement conservés entre les différentes populations résistantes, suggérant l'influence du **fond génétique** des populations (modulé par leur histoire démographique et l'environnement) sur la sélection des gènes et variations impliquées dans la résistance (Rosenheim et Tabashnik 1990). En effet, le potentiel génétique utilisable dans la réponse adaptative aux insecticides (polymorphisme du nombre de copies des gènes, variants alléliques, polymorphisme des régions régulatrices) initialement présent dans une localité semble avoir un impact important sur les gènes/mutations sélectionnées par les insecticides (Georghiou et Taylor 1986). Le fond génétique de chaque population est lui-même conditionné par de nombreux facteurs, liés principalement à l'histoire évolutive et démographique des populations. Les **facteurs environnementaux** influencent également l'expression des gènes, sélectionnant une plasticité ou une expression constitutive importante. C'est par exemple le cas des polluants (Poupardin 2011b; Nkya et al. 2013) et des facteurs abiotiques comme les UVs (Tetreau et al. 2013, 2014, voir annexes) qui agissent sur le système de détoxification des insectes par induction et peuvent causer des adaptations locales susceptibles d'interagir avec la sélection de certains gènes de résistance aux insecticides. De la même façon, les insecticides utilisés sur les populations de moustiques peuvent modifier différenciellement le génome et le transcriptome des différentes populations traitées à l'échelle du globe (Despres et al. 2014, voir annexes). L'historique de LAV joue ainsi potentiellement un rôle majeur, sélectionnant séquentiellement des mécanismes spécifiques de résistance à chaque insecticide, pouvant ainsi conduire à des associations complexes de mécanismes entraînant des phénomènes de résistance multiple/croisées/multiplicatives (Georghiou et Taylor 1986; Hardstone et al. 2009; Edi et al. 2012; Nardini et al. 2013). Enfin, des facteurs biotiques comme les interactions avec certains pathogènes ou avec le microbiote des moustiques (Berticat et al. 2002) sont aussi capables d'influencer les niveaux de résistance (interactions positives ou négatives selon les mécanismes affectés et les coûts physiologiques). Dans ce cadre, une étude d'association entre le **microbiote** des populations d'*Ae. aegypti* utilisées dans cette thèse et leurs niveaux de **résistance** aux insecticides est actuellement en cours en **collaboration** avec l'équipe « écologie microbienne » de l'université Lyon I.

Mécanismes de régulation de l'expression des gènes candidats

La régulation de l'expression de certains gènes, sur-exprimés dans les populations résistantes par rapport aux populations sensibles, semble médiée par des CNVs et/ou par des modifications des éléments *cis*-régulateurs, bien qu'une validation approfondie de ces

derniers soit nécessaire. Toutefois, d'autres mécanismes plus complexes peuvent aussi être impliqués. Ainsi, des éléments *trans*-régulateurs ont déjà été décrits dans les mécanismes de résistance chez *M. domestica*, *D. melanogaster* et *Ae. aegypti* (Grant et Hammock 1992; Liu et Scott 1996; Maitra et al. 2000, 2002) et sont potentiellement présents chez les moustiques. Par ailleurs, la majorité des gènes candidats identifiés chez les moustiques sont décrits comme étant sur-transcrits dans les populations résistantes par rapport aux populations sensibles, ce qui laisse présager de la production accrue de protéines fonctionnelles. Des essais biochimiques montrent souvent une sur-production des familles d'enzymes de détoxification, mais des études protéomiques spécifiques sur les protéines produites par les gènes candidats permettraient une validation complète. Enfin, la sur-production d'une protéine peut aussi être conférée par une meilleure stabilité de l'ARNm (Hoy 2003; Opyrchal et al. 2005; Pedersen et al. 2011). Ces mécanismes toutefois très peu décrits chez les insectes ont été impliqués dans la régulation fine de l'expression de certains gènes de la réponse immunitaire chez *D. melanogaster* (Wei et al. 2009).

Enfin, la découverte des **mécanismes épigénétiques** ouvrent la voie vers de nouvelles hypothèses quant à la régulation et à l'héritabilité de l'expression de certains gènes sans modifications de la séquence d'ADN. Même si l'épigénétique joue un rôle important dans les premiers stades de développement d'un organisme, elle est également largement impliquée dans l'expression des gènes d'un organisme adulte (Jaenisch et Bird 2003). Les trois principaux mécanismes épigénétiques sont les méthylations de l'ADN, la modification des histones et l'expression de microARNs. Des facteurs environnementaux comme les polluants et les pesticides peuvent agir sur ces mécanismes, modifiant l'expression des gènes de façon durable et héritable (Baccarelli et Bollati 2009; Collotta et al. 2013). Se pose alors la question de l'importance des mécanismes épigénétiques dans la résistance des moustiques aux insecticides. Les différents mécanismes épigénétiques ont été bien étudiés chez certains insectes comme le puceron (Srinivasan et Brisson 2012) et des méthylation d'ADN ont été décrites en lien avec la résistance du puceron *Myzus persicae* à différents insecticides (Field et al. 1989). Bien que les méthylations de l'ADN ont généralement un rôle inhibiteur d'expression, la présence de celles décrites par Field et al. (1989) entraînent la sur-expression de l'estérase E4, présentes en plusieurs copies et responsables de la résistance (Field et al. 1989, 1999; Field et Blackman 2003). Par ailleurs, l'absence de méthylations inhibe l'expression de cette estérase, même lors de la présence de multiples copies. L'absence de sélection par les insecticides fait diminuer le niveau de résistance de la population de puceron,

principalement à cause de la perte de ces méthylations au fil de générations (Hick et al. 1996). Bien que ce cas d'étude montre de manière très intéressante et complète l'implication potentielle de l'épigénétique dans la résistance des insectes aux insecticides, très peu d'autres études traitent de ce sujet. Ainsi, les niveaux d'expression des gènes impliqués dans la résistance des moustiques et les divergences observées entre populations trouveront peut-être une explication complète grâce à l'épigénétique.

*Pertinence des mutations *Kdr* comme marqueurs de la résistance à la deltaméthrine*

Plusieurs mutations du canal sodium voltage-dépendant (mutations *Kdr*) ont été identifiées chez les moustiques résistants aux PYRs et au DDT. Parmi les mutations *Kdr* décrites chez *Ae. aegypti*, seules S989P et le F1534C ressortent de nos études comme fortement associées au phénotype de résistance, les mutations V1016G et V1016I étant également présentes respectivement en Asie et en Amérique du sud mais en fréquences trop faibles ($|f(R+) - f(S)| < 40\%$) ou trop proches de la fixation ($|f(R+) - f(R-)| < 5\%$). La mutation S989P apparaît fortement associée à la résistance à la deltaméthrine en Asie, et parfois associée avec la mutation V1016G. Il apparaît par ailleurs que la fréquence de la mutation V1016G est anti-corrélée à celle de la mutation F1534C qui diminue avec l'augmentation du niveau de résistance. Inversement, les fréquences des mutations F1534C et V1016I sont fortement corrélées en Amérique du sud, la mutation F1534C étant fortement associée à la résistance à la deltaméthrine et V1016I présente à des fréquences proches de la fixation dans les populations résistantes. Chez *Ae. aegypti*, les mutations V1016G, V1016I et F1534C sont les plus répandues et les plus souvent reliées au phénotype de résistance aux PYRS à travers le monde (Bregues et al. 2003; Saavedra-Rodriguez et al. 2007; Harris et al. 2010; Liu 2015). Nos résultats ainsi que la littérature traitant de leur rôle dans la résistance sont parfois contradictoires et différentes associations de mutations amenant à des conclusions divergentes sont retrouvées chez *Ae. aegypti*. Ainsi, la mutation F1534C est présente dans les populations résistantes du Brésil, seule ou associée à la mutation V1016I (Linss et al. 2014). La mutation V1016I n'y est par contre jamais retrouvée seule. La mutation I1011M est également présente en Amérique du sud et apparaît parfois associée à la mutation V1016I mais elle semble moins bien associée au phénotype de résistance à la deltaméthrine (Martins et al. 2013). Par ailleurs, une population naturelle asiatique sélectionnée en laboratoire pendant 10 générations à la perméthrine montre une association sur un même haplotype des mutations S989P et V1016G avec le phénotype de résistance (Kasai et al. 2014). De manière intéressante, la mutation

F1434C initialement présente dans la population d'origine décrite dans cette publication n'est plus détectée après sélection, suggérant un rôle mineur dans la résistance au PYR perméthrine. Inversement, Harris et al. (2010) ont montré une forte corrélation entre la fréquence de la mutation F1434C et le niveau de résistance à la perméthrine. Cette mutation semble au final être importante dans la résistance aux PYRs de type I comme la perméthrine mais pas pour les PYRs de type II comme la deltaméthrine (Hu et al. 2011; Du et al. 2013). Selon les résultats de validation fonctionnelle obtenus par Du et al. (2013), cette tendance est également valable pour la mutation I1011M. Selon ces auteurs, les mutations S989P et V1016I ne seraient efficaces face à aucun des types de PYRs alors que la mutation V1016G impacte significativement l'action des PYRs de type I et II.

Si les résultats de validation obtenus par ces auteurs se vérifient, il ressortirait alors que la mutation F1534C n'est pas impliquée dans la résistance à la deltaméthrine, ce qui semble expliquer les résultats que nous avons obtenu avec les populations asiatiques. La mutation V1016I ne semble selon eux pas non plus efficace contre les PYRs, et les très forts niveaux de résistance à la deltaméthrine observés en Amérique du sud ne seraient donc pas dus à des modifications de cibles, pourtant présentes en très fortes fréquences. Enfin en Asie, la part de résistance aux PYRs par modification de la cible serait uniquement due à la mutation V1016G. Les différentes mutations *Kdr* ont récemment été montrées comme appartenant à différents sites du canal sodium (Du et al 2013), interagissant entre eux, ou étant impliquées dans des mécanismes compensatoires (SupYoon et al. 2008) ce qui peut expliquer les tendances contradictoires trouvées par les différents auteurs. Ainsi, il y aurait plusieurs combinaisons de mutations possibles (e.g. plusieurs haplotypes efficaces) entraînant la résistance.

Limites des études

Phénotype de résistance croisée/multiple

Les études portant sur les populations de moustiques utilisées dans les Publications II et III ont été basées sur leur phénotype de résistance à la deltaméthrine. Toutefois, ces populations naturelles ont aussi été exposées et sélectionnées au fil des années avec d'autres molécules insecticides. Il est ainsi probable que ces populations portent des mécanismes de résistance à d'autres insecticides qui sont parfois présents chez les mêmes individus et donc difficiles à séparer. Ainsi, même si un phénotypage ségrégeant les individus les plus sensibles des individus les plus résistants à la deltaméthrine a été réalisé, il n'est pas à exclure que

certaines marqueurs moléculaires identifiés soient liés à une résistance à d'autres insecticides. C'est peut-être le cas des marqueurs identifiés dans les estérases CCEAE3 et CCEAE4A qui ressortent de notre étude comme de bons gènes candidats fortement associées à la résistance à la deltaméthrine (affectés par des amplifications et des mutations ponctuelles non-synonymes), mais qui ont également été associées à la résistance à l'OP téméphos (Grigoraki et al. 2015; Poupardin et al. 2014). Il est toutefois possible que ces gènes puissent être impliqués dans la **résistance à plusieurs insecticides** par l'intermédiaire de mécanismes similaires ou bien par l'intermédiaire de mécanismes différents (e.g. résistance aux OPs conférée par une sur-expression et résistance aux PYRs causée par la sélection de certains variants).

Annotation des génomes

La pertinence des outils de biologie moléculaire et des techniques de séquençage pour l'étude de la résistance des moustiques aux insecticides réside principalement dans le fait que des génomes complets soient séquencés et disponibles. Le travail d'annotation de ces génomes étant long et fastidieux, il reste à l'heure actuelle une proportion importante de gènes qui ne sont **pas annotés**. C'est par exemple le cas de près de 50% des gènes d'*Aedes aegypti* qui ne sont actuellement attribués à aucune catégorie fonctionnelle. L'interprétation de résultats portant sur ces gènes est alors vague, représentant un frein dans l'analyse des données de séquençage. Le travail reposant sur l'analyse des **catégories fonctionnelles** ainsi que l'analyse par clustering est donc préférentiellement centrée sur la partie du génome annotée car les autres gènes n'apportent pas d'information biologique. Toutefois, la proportion de gènes non-annotés ne comprend probablement que peu de gènes impliqués directement dans la résistance, les catégories fonctionnelles potentiellement impliquées dans la résistance étant facilement repérables dans un génome et donc bien annotées (car bien connues chez d'autres organismes). En revanche, il apparaît de plus en plus souvent que des mécanismes secondaires jouent un rôle important dans la résistance (e.g. les éléments régulateurs, la signalisation cellulaire et nerveuse, le comportement...); ils sont alors difficilement appréhendables par les techniques de séquençage haut débit car les gènes associés font potentiellement partie de la partie non-annotée du génome.

III. Perspectives

La caractérisation des gènes candidats chez les moustiques constitue une étape clé vers la meilleure compréhension des mécanismes de résistance aux insecticides. Les nombreuses études visant à identifier les gènes de résistance aux insecticides ont permis d'établir une liste importante de candidats. Concernant la résistance métabolique, beaucoup de gènes différents ont été identifiés, étant rarement conservés entre localités et souvent spécifiques d'un insecticide. Toutefois, ces listes de candidats contiennent probablement de nombreux faux-positifs. Les screenings moléculaires permettant de découvrir ces gènes candidats détectent aussi parfois des faux positifs à cause des problèmes d'hybridations croisées pour les puces à ADN ou d'erreurs d'alignement et d'annotation pour le RNA-seq. Par ailleurs, la complexité de l'historique de sélection d'une population de moustique peut engendrer des phénomènes de résistance multiple, croisée ou multiplicative et plusieurs gènes ou marqueurs peuvent ainsi ressortir en lien avec un phénotype de résistance mais être en réalité majoritairement impliqués dans la résistance à un autre insecticide que celui étudié. De plus, lorsqu'un gène est impliqué dans un phénomène de résistance, toute la région génomique environnante est généralement affectée par la sélection, entraînant d'autres gènes montrant un profil de faux positifs par effet autostop²² (Yan et al. 1998). Enfin, les coûts physiologiques causés par la sélection de gènes de résistance aux insecticides peuvent entraîner des mécanismes compensatoires affectant d'autres gènes et ainsi apparaître comme des faux-positifs vis-à-vis de leur rôle dans la résistance.

Ainsi, afin de pouvoir aller plus loin dans la caractérisation des mécanismes sous-jacents à la résistance, il apparaît essentiel de réduire la liste de gènes candidats en éliminant le plus de **faux positifs** possible. Cette **étape de tri** est réalisable principalement par purification ou affinage du phénotype observé, grâce par exemple à un phénotypage de la résistance à plusieurs insecticides, des sélections et des croisements contrôlés suivis d'une étude quantitative fine d'association génotype/phénotype. Une étape de **validation fonctionnelle** des meilleurs gènes candidats sera ensuite nécessaire afin de comprendre précisément leur fonction et leur rôle dans le phénotype de résistance.

²² L'effet autostop représente le mécanisme par lequel un gène est sélectionné et apparaît relié à un phénotype alors qu'il ne devrait pas l'être, simplement car il est physiquement proche d'un autre gène qui lui a une réelle importance dans le phénotype étudié.

Tri des candidats par association génotype-phénotype (génétique quantitative)

Afin de pouvoir relier finement un gène ou un locus génomique à un trait phénotypique précis, l'objectif de cette méthode est de supprimer un maximum de liaisons physiques entre les différents gènes sélectionnés ensemble par effet autostop en s'appuyant sur la recombinaison génétique. Dans le cas d'un phénotype de résistance à un insecticide, des rétro-croisements entre la population résistante à étudier et une population sensible pendant plusieurs générations, couplés à une sélection avec l'insecticide étudié, permettent de purifier les *loci* associés avec la résistance (**Figure 31**). Ces individus sont ensuite phénotypés précisément pour le trait étudié puis des associations fortes entre le phénotype et des marqueurs sont recherchés par analyse statistique.

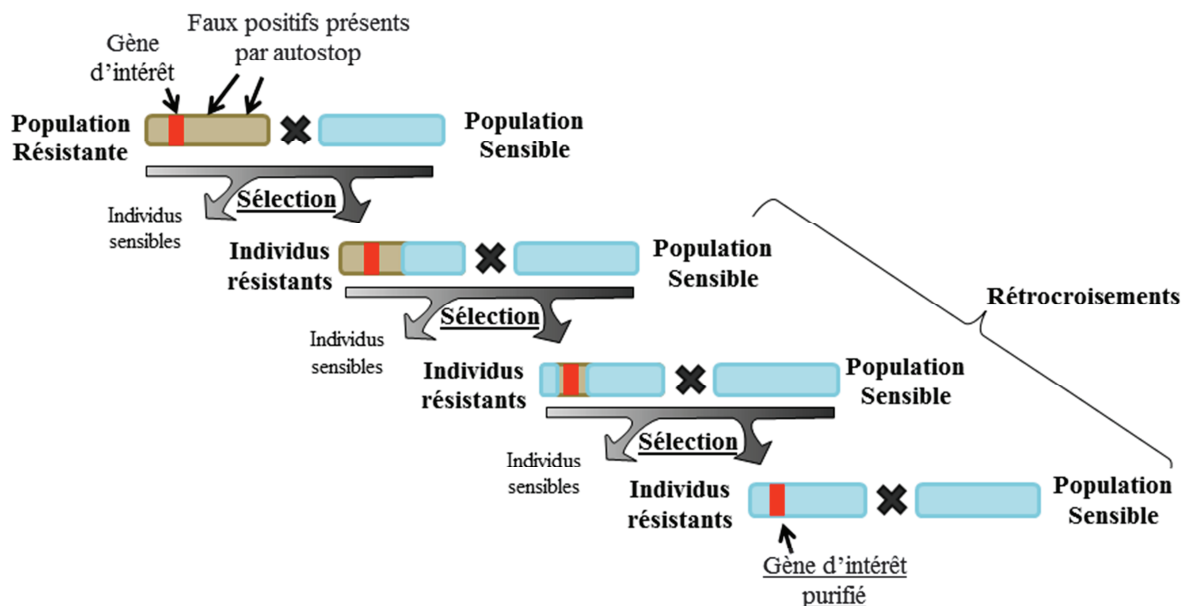


Figure 31: Schéma de principe de la recombinaison génétique par rétro-croisements.

Ce travail a déjà été initié par le lancement de trois « métapopulations résistantes » représentatives de Thaïlande, de Guyane et de Guadeloupe. Pour chaque localité, plusieurs populations résistantes ont été mélangées et sont en cours de croisement. Le but de telles populations est de créer une population résistante modèle représentative de la diversité génétique de toute une région, puis de réaliser des rétrocroisements avec une population sensible afin d'obtenir un maximum de recombinaisons possible pour purifier les gènes et allèles de résistance. Les associations génotypes phénotypes seront réalisées suite à plusieurs

phénotypes avec différents insecticides, afin d'attribuer les différents marqueurs au bon phénotype de résistance.

Une fois la liste de gènes candidats réduite aux plus pertinents, une étape de validation fonctionnelle est nécessaire. En effet, ces marqueurs ont été détectés en lien avec la résistance, mais leur rôle précis est encore inconnu. Différentes techniques de validations sont alors envisageables selon le type de marqueur à valider (sur-expression, mutation non-synonyme, variation de promoteurs...), comme l'expression en système hétérologue suivi d'un essai de métabolisation *in vitro* de l'insecticide et/ou d'essais de séquestration, l'interférence ARN et la prédiction *in silico* des propriétés d'interactions enzyme/insecticide. Par ailleurs, la découverte récente du système CRISPR-Cas9 représente une opportunité très prometteuse pour la validation des différents marqueurs de résistance chez le moustique.

Validation fonctionnelle

Expression en système hétérologue et caractérisation des interactions enzymes-insecticides

Plusieurs gènes candidats, généralement des P450s, ont déjà été validés comme capables de dégrader différentes molécules insecticides (voir Chapitre I). La plupart du temps, ces gènes ont été exprimés en système hétérologue puis leur capacité de dégradation de l'insecticide a été évaluée *in vitro*. Il existe trois principaux systèmes d'expression hétérologue utilisés pour la validation fonctionnelle des gènes d'insecte (Padh et Rai 2001) : le système bactérien (*E. coli*), le système levure (*Saccharomyces sp.*) et le système baculovirus/cellules d'insectes. Les protéines produites dans ces systèmes peuvent être utilisées dans des essais de métabolisme ou de séquestration *in vitro*, permettant d'étudier les propriétés de dégradation envers différents insecticides, en présence d'inhibiteurs variés et en testant plusieurs variants d'une même enzyme.

Un système d'expression hétérologue en levure est disponible au LECA (Pompon et al. 1996; Chandor-Proust et al. 2013) et la production de P450s candidats à la résistance aux PYRS par des levures a été réalisée au début de ma thèse pour mettre au point la technique en vue de la validation de certains gènes en fin de thèse. Ainsi CYP6M11 d'*Ae. aegypti* (homologue de CYP6M2 d'*An. gambiae* déjà validé, Stevenson et al. 2011) et CYP6P4 et CYP6P5 d'*An. gambiae* (homologue de CYP6P3 déjà validé), (Müller et al. 2008), ont été produits avec succès (**Figure 32**).

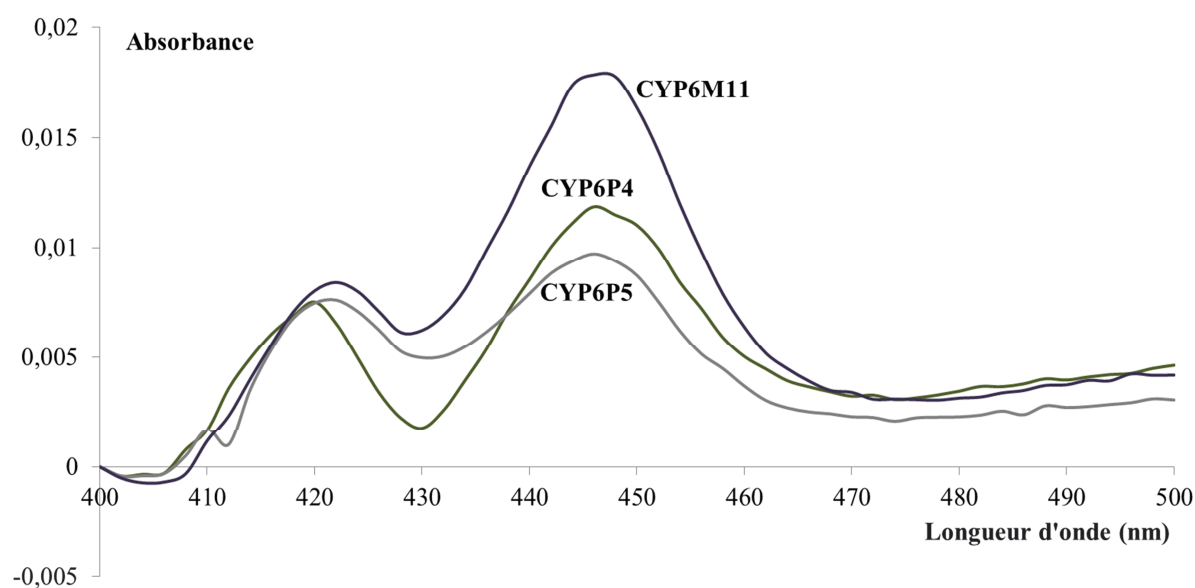


Figure 32: Spectres CO (monoxyde de carbone) d'absorption des P450 CYP6P4, CYP6P5 et CYP6M11.

Même si le système « levure » a déjà permis de produire CYP6Z8 de manière fonctionnelle et de démontrer son implication dans la voie de biodégradation des pyréthriinoïdes (Chandor-Proust et al. 2013) les P450s produits au cours de ma thèse ne montrent aucune métabolisation des substrats universels (Ethoxy-,Methoxy-,Pentoxy-,Benzylo- resorufine ainsi que substrat dérivés de la luciférine contenu dans le kit P450-Glo (Proméga)). Leur caractère fonctionnel n'a ainsi jamais pu être prouvé. Cette méthode présente pourtant l'avantage d'être très fidèle à la réalité biologique des moustiques en fournissant un assemblage membranaire comprenant le P450 ainsi que le cofacteur obligatoire (P450 réductase). Néanmoins, la lourdeur de mise en œuvre de cette technique et la difficulté d'obtenir de grandes quantités de P450s n'ont pas permis de produire les P450s issus de la thèse.

Interférence ARN

La technique de validation fonctionnelle par interférence ARN (ARNi) se base sur un processus cellulaire naturel de régulation de l'expression des gènes (Ecker et Davis 1986) (**Figure 33 a.**). Cette technique vise à introduire dans un organisme des ARNs double brins (ARNdb) spécifiques à la séquence des ARNm messagers que l'on veut dégrader afin d'inhiber l'expression du gène en question (Fire et al. 1998). Après inhibition de l'expression de ce gène, l'impact sur le phénotype est évalué permettant de valider le rôle du gène dans le phénotype étudié. Les ARNdb peuvent être introduits dans l'organisme à étudier par injection ou par ingestion. La méthode par injection a montré une bonne efficacité chez les moustiques

adultes (Blitzer et al. 2005; Berois et al. 2012; Lamacchia et al. 2013) mais a rarement été utilisée pour valider le rôle d'un ou plusieurs gènes dans la résistance aux insecticides (Lycett et al. 2006; Yang et al. 2010). Au cours de ma thèse, j'ai évalué le potentiel de la technique de RNAi par injection pour éteindre l'expression et valider le rôle des gènes candidats à la résistance (**Figure 33 b.**).

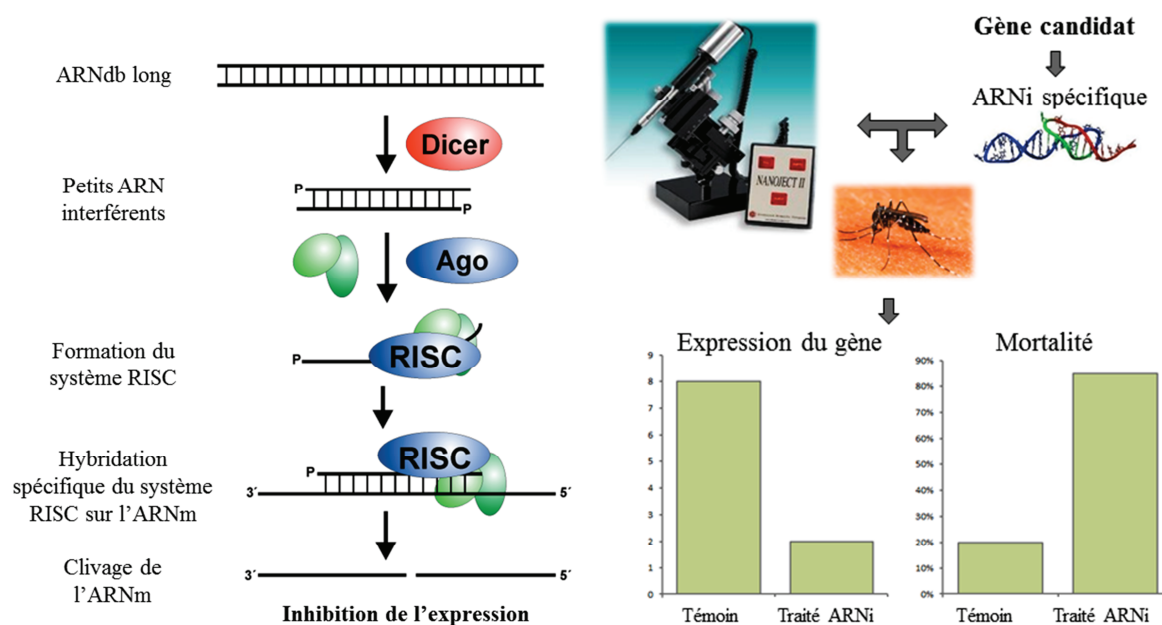


Figure 33 : Principe de l'interférence ARN (a.) et application chez le moustique pour la validation des gènes candidats (b.).

Les essais ont été réalisés sur 5 gènes candidats (**Figure 34**), mais une inhibition d'expression n'est observée que pour l'estérase CCEAE3A. De plus, afin de relier la diminution de l'expression d'un gène candidat avec un retour à la sensibilité à un insecticide, il est nécessaire de pouvoir évaluer de manière fine et reproductible le niveau de résistance des individus testés. Les bioessais sur papiers imprégnés ne permettant pas ce degré de précision, la méthode de bioessais par application topique a été envisagée. Malheureusement, le faible taux de réussite et de reproductibilité des résultats d'injection et des bioessais topiques nous a conduit à abandonner l'approche de l'interférence ARN, trop risquée et trop lourde à mettre en place en fin de thèse.

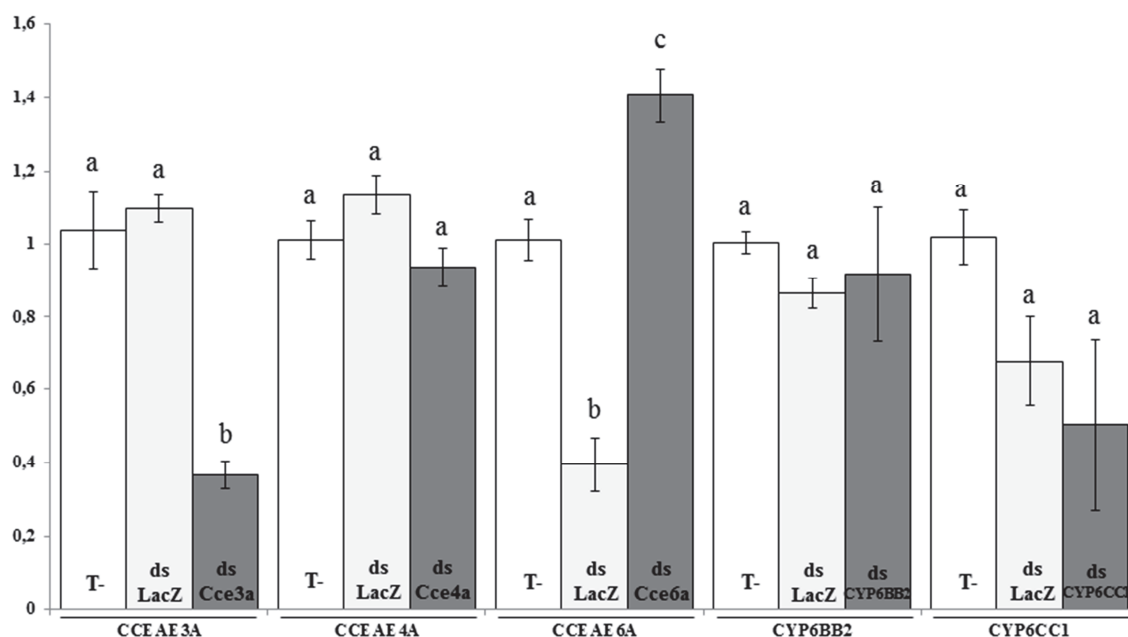


Figure 34: Résultats de l'inhibition de l'expression des gènes CCEAE3A, CCEAE4A, CCEAE6A, CYP6BB2 et CYP6CC1 après injection d'ARN double brin. Les injections ont été réalisées sur 3 lots de 10 femelles non-gravides de 2-5 jours pour chaque gène et chaque condition testée (dsLacZ = témoin d'injection d'ARNdb correspondants au gène LacZ et ds « gène » = injection de l'ARNdb correspond au gène à « éteindre »). T- représente des lots d'individus non injectés mais ayant subi la phase d'endormissement au froid comme les individus injectés. Environ 150ng d'ARNdb ont été injectés dans le mésothorax des femelles en deux injections de 69nl. L'expression a été mesurée 48 heures après l'injection par RT-qPCR.

Modélisation in silico

La cristallisation de protéines a permis l'élaboration de structures tri-dimensionnelles informatisées, sur lesquelles il est possible d'adapter une séquence protéique d'intérêt afin de prédire les différentes interactions enzymes/substrat. Cette technique a été utilisée sur plusieurs P450s de moustiques permettant de mettre en évidence leur implication probable dans la dégradation des insecticides (Lertkiatmongkol et al. 2011; Stevenson et al. 2011; Riaz et al. 2013; Chandor-Proust et al. 2013). Même si les prédictions semblent cohérentes avec des observations dans le système biologique (Chiu et al. 2008), cette technique a toutefois une limite importante inhérente au modèle. En effet, le P450 cristallisé servant de structure de base est un P450 humain (CYP3A4, (Yano et al. 2004)) présentant moins de 30% d'homologie de séquence avec les P450s de moustique. Un projet de cristallisation du P450 CYP6M2 d'*An. gambiae* en cours (M. Paine, communication personnelle, Projet EU FP7 AvecNet), ce qui permettra d'améliorer la fiabilité des prédictions *in silico* à venir.

Modifications de l'ADN : le système CRISPR-Cas9

Suite à l'utilisation de l'ARN interférent pour inhiber de façon sélective l'expression des gènes à la demande, de nouvelles approches de génie moléculaire ont vu le jour comme les nucléases « zinc fingers » (ZNFs)²³, les nucléases « TAL effectors » (TALENs)²² et les nucléases « clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat » (CRISPR). Ces techniques permettant la manipulation et le remaniement de l'ADN sont basées sur la reconnaissance spécifique de sites dans la molécule d'ADN. Les TALENs ont par exemple été utilisées avec succès sur *Ae. aegypti* pour contrôler la pigmentation des yeux (Aryan et al. 2013), montrant leur potentiel pour la manipulation génétique de ce moustique. Les approches ZNFs et TALENs souffrent toutefois de nombreux freins à leur application rendant leur utilisation en routine difficile. Le système CRISPR-Cas9 publié en 2012 représente alors une alternative de choix, permettant une manipulation facile et peu coûteuse des génomes (Doudna et Charpentier 2014). Dans la nature, le système CRISPR-Cas9 permet aux bactéries de s'immuniser contre les virus et les plasmides étrangers, en reconnaissant et clivant de manière spécifique leur séquence nucléique. Adopté et optimisé par de nombreuses équipes de recherche, ce système permet actuellement de créer des insertions, des délétions, des mutations et des remplacements de fragments de l'ADN ciblé, ainsi que de marquer des cibles précises dans le génome ou de réguler l'expression de gènes d'intérêt. Même si des limites existent quant aux actions non spécifiques du système ou à la méconnaissance des interactions avec le contexte génomique ou épigénomique, l'effort de recherche fourni actuellement permettra rapidement de pallier ces inconvénients. Cette approche constitue d'ores et déjà un outil puissant pour la manipulation génétique chez les moustiques (Basu et al. 2015; Kistler et al. 2015), et peut être utilisée pour la validation du rôle des gènes candidats, permettant de moduler leur expression ou de recréer des mutations suspectées d'être impliquée dans la résistance (**Figure 35**).

²³ Les « nucléases à doigt de zinc » et les « nucléases effectrices de type activateur de transcription » sont des enzymes de restriction artificielles qui permettent de reconnaître et de cliver spécifiquement des endroits précis du génome.

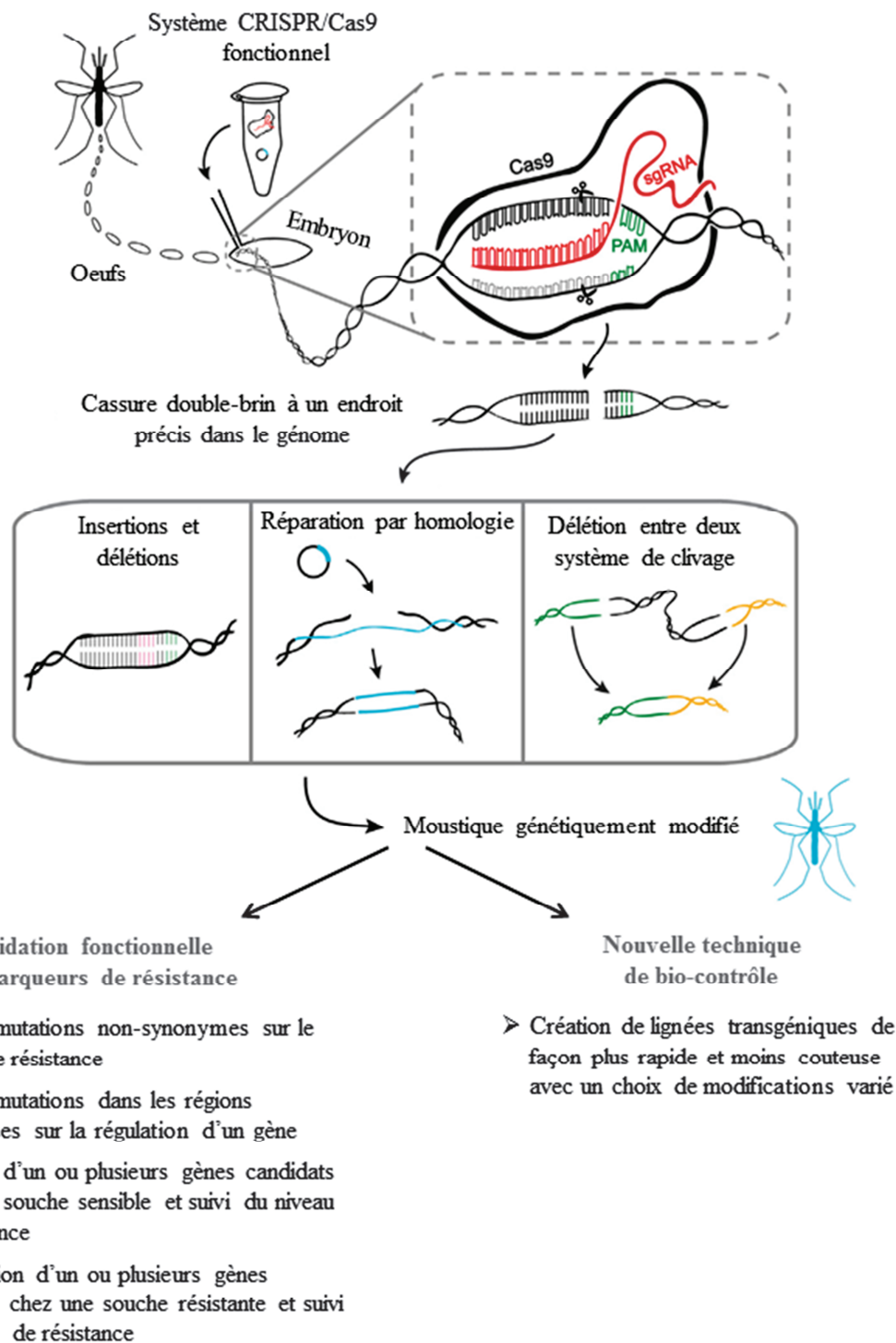


Figure 35: Le système CRISPR-Cas9 pour l'étude de la résistance des moustiques aux insecticides et leur potentiel futur en tant que moyen de bio-contrôle (adapté de Kistler et al. 2015). CRISPR-Cas9 est injecté dans des embryons de moustiques, puis les nucléases vont couper spécifiquement le génome des cellules de l'embryon à un ou plusieurs endroits précis. Les mécanismes de réparation de l'ADN de l'insecte ou du système CRISPR-cas9 vont alors engendrer des modifications de la séquence ADN, pouvant être de l'ordre d'une modification ponctuelle (séquence codante ou promotrice) ou d'une insertion/suppression de gènes complet.

IV. Vers de nouveaux outils diagnostiques de la résistance

Un des intérêts majeurs de la caractérisation des **marqueurs moléculaires** de la résistance à différents insecticides chez les moustiques est de pouvoir les utiliser pour détecter de manière **précoce** les différents mécanismes de résistance sur le terrain et de suivre leur dynamique spatio-temporelle. Afin d'atteindre cet objectif, il est nécessaire de valider les marqueurs trouvés dans cette thèse, de détecter de nouveaux marqueurs associés à d'autres zones géographiques, et de les tester sur plusieurs populations résistantes d'origines variées avant de développer un outil diagnostique à **grande échelle**. Le projet WIRED, rassemblant des partenaires du monde entier, est en cours de lancement et permettra de cartographier de manière précise les niveaux et mécanismes de résistance des moustiques notamment grâce à l'utilisation d'outils diagnostiques moléculaires de la résistance.

Bien que la plupart des marqueurs identifiés n'apparaissent pas universels, leur intégration dans un **outil moléculaire diagnostique** reste envisageable. Cet outil pourrait comprendre l'ensemble des différents marqueurs identifiés sur chaque continent mais des outils distincts spécifiques à certaines régions pourraient aussi être développés. Plusieurs types d'outils diagnostiques sont possibles, basés par exemple sur le principe des **PCRarrays** (Qiagen), de l'amplification **LAMP** (Notomi et al 2000) ou alors des nouvelles générations de séquenceurs miniatures portables de type « **MinION** » (Mikheyev et Tin 2014). Le développement de tels outils permettra d'identifier rapidement et de manière fiable les caractéristiques de résistance d'un grand nombre de populations de moustiques de terrain (**Figure 36**). Un tel outil se doit d'être simple d'utilisation, peu coûteux et de permettre à partir d'une simple extraction d'ADN d'obtenir une information rapide (moins d'une journée) sur les mécanismes de résistance de la population étudiée. Le PCRarray consiste en des plaques qPCR préchargées avec des amorces spécifiques des différents marqueurs. Ces plaques sont remplies par l'utilisateur avec un mix qPCR et les échantillons d'ADN, et l'analyse comparative automatisée des profils d'amplification entre la population étudiée et la population de référence permet de déduire la présence des différents marqueurs de résistance. Le séquençage « MinION » permet d'avoir un module de séquençage rapide et portable avec système de préparation de l'échantillon intégré (**VolTRAX**). Les séquences obtenues des différentes populations étudiées pourraient ainsi être comparées de façon automatique à une séquence de référence afin de détecter certains marqueurs de résistance. Enfin, l'amplification LAMP permet de réaliser une amplification ADN sans thermocycleur, à une température constante de 65°C facilement obtenue avec un simple bain-marie. Les résultats

d'amplification peuvent ensuite être lus visuellement. Cette technique semble très intéressante dans le cadre d'un **cahier des charges** nécessitant un outil de faible coût et d'utilisation simple et rapide, mais la recherche de nombreux marqueurs avec cette technique peut rapidement multiplier le nombre de réactions, rendant la manipulation trop fastidieuse.

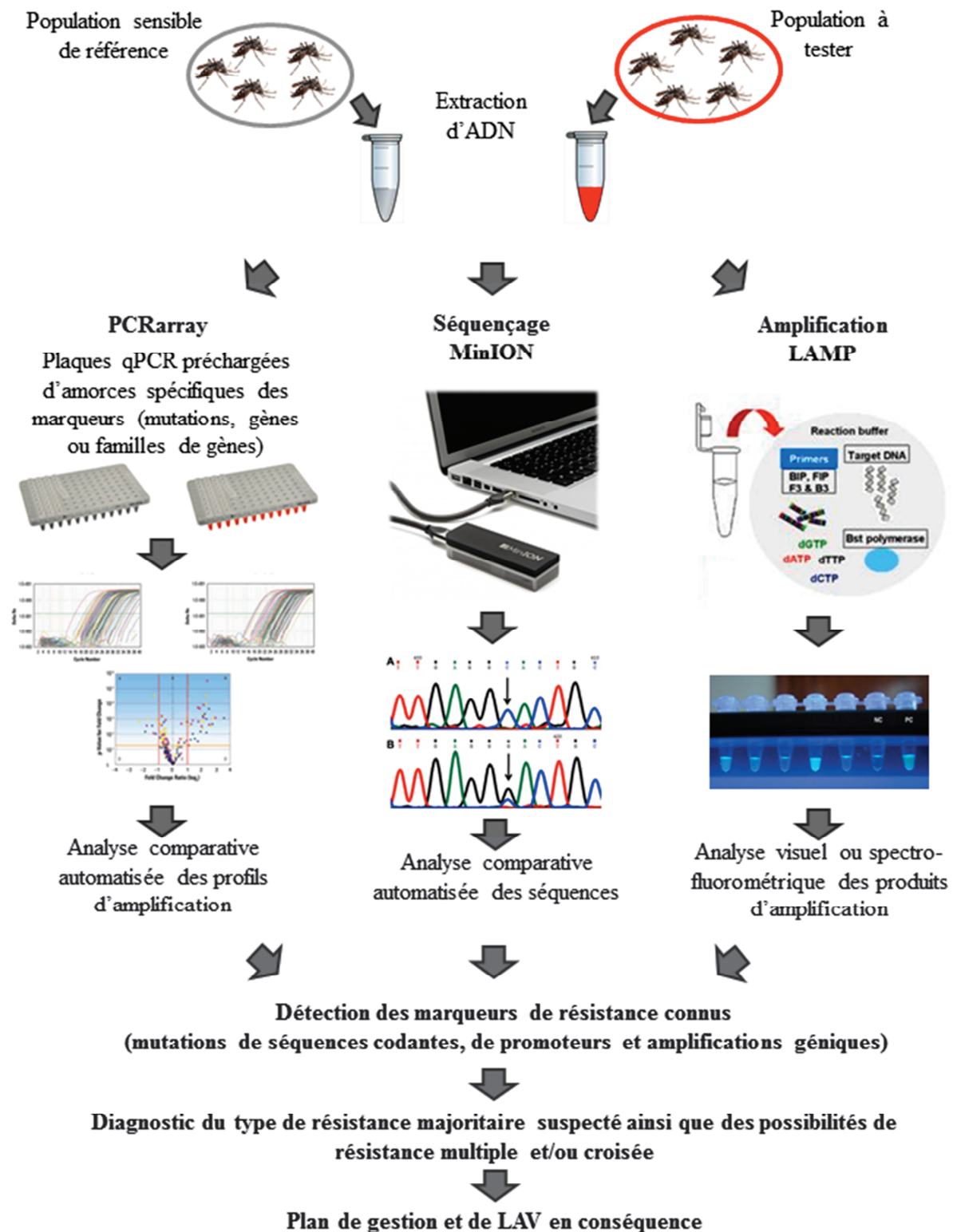


Figure 36: Outils de diagnostic de la résistance: quelques pistes potentielles.

V. Conclusion

Face aux enjeux sanitaires liés aux maladies à transmission vectorielle, le contrôle des populations de moustiques représente une préoccupation mondiale. Aujourd'hui, les programmes de LAV sont principalement basés sur l'utilisation d'insecticides chimiques. Malheureusement, leur utilisation massive associée à la forte capacité adaptative des moustiques a entraîné l'apparition rapide de **phénomènes de résistance** à toutes les classes d'insecticides disponibles en santé publique. Par ailleurs, ces insecticides sont souvent très toxiques pour l'Homme et l'environnement, et leur interdiction progressive réduit rapidement la liste des molécules utilisables en santé publique. En attendant la mise sur le marché de nouvelles molécules plus spécifiques ou de nouveaux moyens de contrôle, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de la résistance. Dans ce cadre, les modifications génomiques causales de la résistance constituent des marqueurs intéressants en vue de développer des outils moléculaires diagnostiques de la résistance, qui permettront un meilleur suivi des différents mécanismes de résistance sur le terrain et une gestion raisonnée de la LAV. Dans ce cadre, la présente thèse a permis de mettre évidence la puissance du séquençage haut-débit pour la recherche des marqueurs de résistance. La combinaison de différentes approches de séquençage haut débit apparaît comme très pertinente pour disséquer les différents mécanismes moléculaires responsables de la résistance aux insecticides chez les moustiques.

L'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse fait apparaître que la résistance des moustiques aux insecticides est **multimodale**, composée de mécanismes différents issus de caractères génétiques spécifiques dépendants de l'histoire évolutive et de l'environnement des populations (**Figure 37**). Ainsi, selon les régions et/ou les facteurs environnementaux, certains facteurs génétiques présents dans les populations sont sélectionnés par les insecticides utilisés en LAV, aboutissant à des profils de résistance variés pour un même insecticide. Des profils de résistance complexes (résistance croisée/multiple/multiplicative) peuvent ainsi émerger selon les situations. Tandis que les mutations de cibles sont relativement bien conservées (e.g. *loci Kdr* conservés mais mutations variables), la diversité des facteurs génétiques associés à la résistance métabolique semble beaucoup plus importante (natures des gènes, CNVs, mutations ...). Ainsi, les différents fonds génétiques représentés au sein des populations constituent des « **boîtes à outils** » complètes, contenant chacune une grande variété d'outils (=gènes) plus ou moins efficaces pour résister aux insecticides, mais le « choix » final du/des outils utilisés au sein d'une population dépend de leur « accessibilité »

(= plus propices à la sélection) lors des premières étapes de sélection. Ensuite, la forte pression de sélection engendrée par les insecticides favorisera les combinaisons d'outils montrant la meilleur « **efficacité** » (= rôle dans le phénotype de résistance par rapport au coût génétique).

Cette complexité des mécanismes de résistance rend leur compréhension longue et difficile car elle fait intervenir de nombreuses approches techniques, nécessitant chacune des compétences bien particulières. Le développement constant des stratégies de séquençage haut débit permettront probablement de généraliser et de rendre de plus en plus accessible les approches « haut-débit ». L'avenir des « **-omiques** » pour l'étude des caractères adaptatifs sera alors de pouvoir croiser plus facilement toutes ces approches, de recouper les données produites, permettant de découvrir de nouveaux mécanismes de résistance aux interfaces entre **la génomique, l'épigénomique et la transcriptomique**.

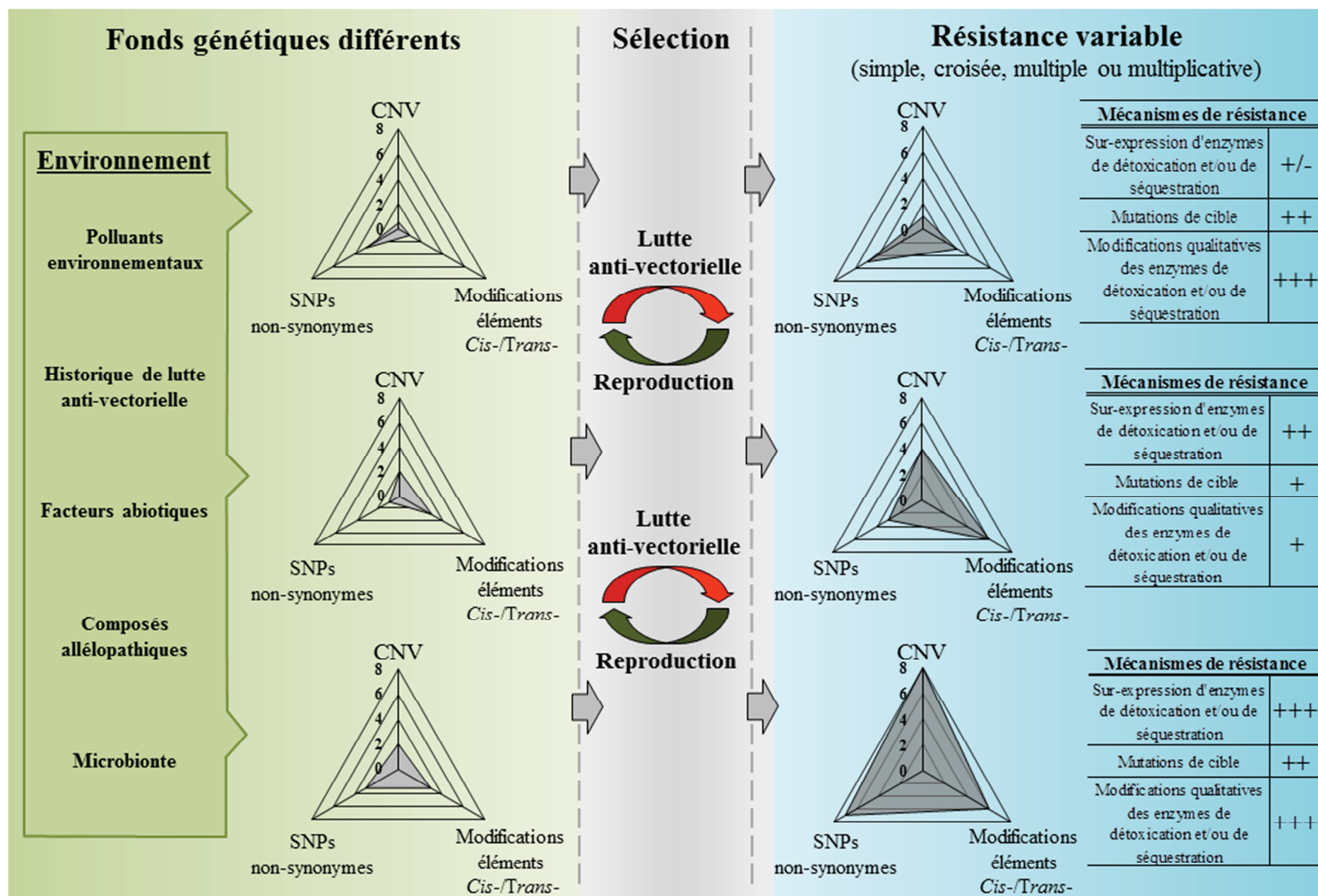


Figure 37: Schéma de synthèse décrivant les mécanismes génétiques à l'origine de la résistance des moustiques aux insecticides. D'autres mécanismes peu évoqués dans cette thèse peuvent agir en plus de ceux présentés ici, comme par exemple la duplication des canaux ioniques et la résistance cuticulaire.

Références citées

- afssaps. 2009. *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé suite à la demande d'avis relatif à une étude sur la toxicité du N,N-diéthyl-3-méthylbenzamide (DEET)*.
- Aldridge WN. 1953. Serum esterases .1.2 types of esterases (A and B) hydrolysing para-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination. *Biochem J* **53**: 110-117.
- Alon M, Alon F, Nauen R, Morin S. 2008. Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 940-949.
- Alout H, Ndam NT, Sandeu MM, Djégbe I, Chandre F, Dabiré RK, Djogbénou LS, Corbel V, Cohuet A. 2013. Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* Field Isolates. *PLoS One* **8**: e63849.
- Amichot M, Tarés S, Brun-Barale A, Arthaud L, Bride JM, Bergé JB. 2004. Point mutations associated with insecticide resistance in the *Drosophila* cytochrome P450 Cyp6a2 enable DDT metabolism. *Eur J Biochem* **271**: 1250-1257.
- Andersen JF, Utermohlen JG, Feyereisen R. 1994. Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system. *Biochemistry* **33**: 2171-2177.
- Arensburger P, Megy K, Waterhouse RM, Abrudan J, Amedeo P, Antelo B, Bartholomay L, Bidwell S, Caler E, Camara F, et al. 2010. Sequencing of *Culex quinquefasciatus* Comparative Genomics. *Science (80-)* **330**: 1-3.
- Aryan A, Anderson M a. E, Myles KM, Adelman ZN. 2013. TALEN-Based Gene Disruption in the Dengue Vector *Aedes aegypti*. *PLoS One* **8**: e60082.
- Baccarelli A, Bollati V. 2009. Epigenetics and environmental chemicals. *Curr Opin Pediatr* **21**: 243-251.
- Basu S, Aryan A, Overcash JM, Samuel GH, Anderson M a E, Dahlem TJ, Myles KM, Adelman ZN. 2015. Silencing of end-joining repair for efficient site-specific gene insertion after TALEN/CRISPR mutagenesis in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 4038-4043.
- Baumann P, Clark M a, Baumann L, Broadwell a H. 1991. *Bacillus sphaericus* as a mosquito pathogen: properties of the organism and its toxins. *Microbiol Rev* **55**: 425-36.
- Bell CG, Beck S. 2009. Advances in the identification and analysis of allele specific expression. *Genome Med* **1**: 56.

- Bergé JB, Feyereisen R, Amichot M. 1998. Cytochrome P450 monooxygenases and insecticide resistance in insects. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **353**: 1701-1705.
- Berois M, Romero-Severson J, Severson DW. 2012. RNAi knock-downs support roles for the mucin-like (AeIMUC1) gene and short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) gene in *Aedes aegypti* susceptibility to *Plasmodium gallinaceum*. *Med Vet Entomol* **26**: 112-115.
- Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu a., Weill M. 2002. High Wolbachia density in insecticide-resistant mosquitoes. *Proc R Soc B Biol Sci* **269**: 1413-1416.
- Blitzer EJ, Vyazunova I, Lan Q. 2005. Functional analysis of AeSCP-2 using gene expression knockdown in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **14**: 301-307.
- Bolger a. M, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114-2120.
- Bonds J a S. 2012. Ultra-low-volume space sprays in mosquito control: A critical review. *Med Vet Entomol* **26**: 121-130.
- Borkent A, Grimaldi D a. 2004. The Earliest Fossil Mosquito (Diptera: Culicidae), in Mid-Cretaceous Burmese Amber. *Ann Entomol Soc Am* **97**: 882-888.
- Breckenridge CB, Holden L, Sturgess N, Weiner M, Sheets L, Sargent D, Soderlund DM, Choi J-S, Symington S, Clark JM, et al. 2009. Evidence for a separate mechanism of toxicity for the Type I and the Type II pyrethroid insecticides. *Neurotoxicology* **30**: S17-S31.
- Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, McCarroll L, Duchon S, Guillet P, Manguin S, Morgan JC, Hemingway J. 2003. Pyrethroid and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol* **2003**: 87-94.
- Brent MR. 2005. Genome annotation past, present, and future: how to define an ORF at each locus. *Genome Res* **15**: 1777-1786.
- Brito LP, Linss JGB, Lima-Camara TN, Belinato T a., Peixoto A a., Lima JBP, Valle D, Martins AJ. 2013. Assessing the Effects of *Aedes aegypti* kdr Mutations on Pyrethroid Resistance and Its Fitness Cost. *PLoS One* **8**.
- Brooke BD, Hunt RH, Matambo TS, Koekemoer LL, Van Wyk P, Coetzee M. 2006. Dieldrin resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* in Ghana. *Med Vet Entomol* **20**: 294-299.
- Brown AW. 1978. *Ecology of pesticides*. éd. N.-Y. John Wiley & Sons.
- Burmester T. 1999. Evolution and function of the insect hexamerins. *Eur J Entomol* **96**: 213-225.

- Cai Y, Konishi T, Han G, Campwala KH, French SW, Wan Y-JY. 2002. The role of hepatocyte RXR alpha in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways. *Eur J Pharm Sci* **15**: 89-96.
- Campbell PM, Newcomb RD, Russell RJ, Oakeshott JG. 1998. Two different amino acid substitutions in the ali-esterase, E3, confer alternative types of organophosphorus insecticide resistance in the sheep blowfly, *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **28**: 139-150.
- Chandor-Proust a, Bibby J, Regent-Kloeckner M, Roux J, Guittard-Crilat E, Poupardin R, Riaz M a, Paine M, Dauphin-Villemant C, Reynaud S, et al. 2013. The central role of mosquito cytochrome P450 CYP6Zs in insecticide detoxification revealed by functional expression and structural modelling. *Biochem J* **455**: 75-85.
- Chandra G, Bhattacharjee I, Chatterjee SN, Ghosh a. 2008. Mosquito control by larvivorous fish. *Indian J Med Res* **127**: 13-27.
- Chang C, Shen WK, Wang TT, Lin YH, Hsu EL, Dai SM. 2009. A novel amino acid substitution in a voltage-gated sodium channel is associated with knockdown resistance to permethrin in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **39**: 272-278.
- Charles JF, Nielson-LeRoux C, Delécluse a. 1996. *Bacillus sphaericus* toxins: molecular biology and mode of action. *Annu Rev Entomol* **41**: 451-472.
- Che-mendoza A, Penilla RP, Rodríguez DA. 2009. Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes : A review. *J Biotechnol* **8**: 1386-1397.
- Chiu T-L, Wen Z, Rupasinghe SG, Schuler M a. 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 8855-8860.
- Claudianos C, Russell RJ, Oakeshott JG. 1999. The same amino acid substitution in orthologous esterases confers organophosphate resistance on the house fly and a blowfly. *Insect Biochem Mol Biol* **29**: 675-686.
- Clements A. 1992. *Biology of mosquitoes : Development, Nutrition and Reproduction*. éd. Chapman et Hall.
- Collotta M, Bertazzi P a., Bollati V. 2013. Epigenetics and pesticides. *Toxicology* **307**: 35-41.
- Coppin CW, Jackson CJ, Sutherland T, Hart PJ, Devonshire AL, Russell RJ, Oakeshott JG. 2012. Testing the evolvability of an insect carboxylesterase for the detoxification of synthetic pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **42**: 343-352.
- Corbel V, Stankiewicz M, Pennetier C, Fournier D, Stojan J, Girard E, Dimitrov M, Molgó J, Hougard J-M, Lapiéd B. 2009. Evidence for inhibition of cholinesterases in insect and mammalian nervous systems by the insect repellent deet. *BMC Biol* **7**: 47.

- Daborn PJ, Lumb C, Boey A, Wong W, ffrench-Constant RH, Batterham P. 2007. Evaluating the insecticide resistance potential of eight *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 genes by transgenic over-expression. *Insect Biochem Mol Biol* **37**: 512-519.
- Daborn PJ, Yen JL, Bogwitz MR, Le Goff G, Feil E, Jeffers S, Tijet N, Perry T, Heckel D, Batterham P, et al. 2002. A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science* **297**: 2253-2256.
- David J, Ismail HM, Chandor-proust A, Ingraham MJ, John M, Paine I. 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance : impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth Role of cytochrome P450s in insecticide resistance : impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecti. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **368**: 12.
- David J-P, Faucon F, Chandor-Proust A, Poupardin R, Riaz MA, Bonin A, Navratil V, Reynaud S. 2014. Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics* **15**: 174.
- David J-P, Strode C, Vontas J, Nikou D, Vaughan A, Pignatelli PM, Louis C, Hemingway J, Ranson H. 2005. The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 4080-4.
- Dermauw W, Van Leeuwen T. 2014. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **45**: 89-110.
- Despres L, Stalinski R, Faucon F, Navratil V, Viari a., Paris M, Tetreau G, Poupardin R, Riaz M a., Bonin a., et al. 2014. Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito. *Biol Lett* **10**: 20140716-20140716.
- Devonshire AL. 1977. The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem J* **167**: 675-683.
- Devonshire AL, Heidari R, Huang HZ, Hammock BD, Russell RJ, Oakeshott JG. 2007. Hydrolysis of individual isomers of fluorogenic pyrethroid analogs by mutant carboxylesterases from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* **37**: 891-902.
- Devonshire AL, Moores GD. 1982. A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic Biochem Physiol* **18**: 235-246.
- Devonshire AL, Moores GD, Ffrench-Constant RH. 1986. Detection of insecticide resistance by immunological estimation of carboxylesterase activity in *Myzus persicae* (Sulzer) and cross reaction of the antiserum with *Phorodon humuli* (Schrank) (Hemiptera: Aphididae). *Bull Entomol Res* **76**: 97-107.

- Devonshire AL, Sawicki RM. 1979. Insecticide-resistant *Myzus persicae* as an example of evolution by gene duplication. *Nature* **280**: 140-141.
- Diallo D, Sall A a., Diagne CT, Faye O, Faye O, Ba Y, Hanley K a., Buenemann M, Weaver SC, Diallo M. 2014. Zika Virus Emergence in Mosquitoes in Southeastern Senegal, 2011. *PLoS One* **9**: e109442.
- Dimopoulos G. 2003. Insect immunity and its implication in mosquito – malaria interactions. *Cell Microbiol* **5**: 3-14.
- Doudna J a., Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-)* **346**: 1258096-1258096.
- Du Y, Nomura Y, Satar G, Hu Z, Nauen R, He SY, Zhorov BS, Dong K. 2013. Molecular evidence for dual pyrethroid-receptor sites on a mosquito sodium channel. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 11785-11790.
- Dunkov BC, Guzov VM, Mocelin G, Shotkoski F, Brun A, Amichot M, Ffrench-constant RH, Feyereisen R. 1997. Drosophila Cytochrome P450 Gene Cyp6a2: Induction by Phenobarbital. *DNA Cell Biol* **16**: 1345-1356.
- Ecker JR, Davis RW. 1986. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5372-5376.
- Edi CV a, Koudou BG, Jones CM, Weetman D, Ranson H. 2012. Multiple-insecticide resistance in anopheles gambiae mosquitoes, southern côte d’ivoire. *Emerg Infect Dis* **18**: 1508-1511.
- Edi C V, Djogbénou L, Jenkins AM, Regna K, Muskavitch M a T, Poupardin R, Jones CM, Essandoh J, Kétoh GK, Paine MJI, et al. 2014. CYP6 P450 enzymes and ACE-1 duplication produce extreme and multiple insecticide resistance in the malaria mosquito Anopheles gambiae. *PLoS Genet* **10**: e1004236.
- El-Oshar M a., Kodama O, Motoyama N, Dauterman WC. 1987. Studies on the metabolism of vamidothion and its thioanalog in insecticide-resistant and susceptible house fly strains. *Pestic Biochem Physiol* **27**: 132-141.
- Enayati a. a., Ranson H, Hemingway J. 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Mol Biol* **14**: 3-8.
- Espah Borujeni a., Channarasappa a. S, Salis HM. 2014. Translation rate is controlled by coupled trade-offs between site accessibility, selective RNA unfolding and sliding at upstream standby sites. *Nucleic Acids Res* **42**: 2646-2659.
- Faucon F, Dusfour I, Gaude T, Navratil V, Boyer F, Chandre F, Sirisopa P, Thanispong K, Juntarajumnong W, Poupardin R, et al. 2015. Unravelling genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. *Genome Res* 1-13.

- Félix R, Silveira H. 2012. The Role of *Anopheles gambiae* P450 Cytochrome in Insecticide Resistance and Infection. *Insectic - Pest Eng* **23**: 17.
- Ffrench-Constant RH, Anthony N, Aronstein K, Rocheleau T, Stilwell G. 2000. Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annu Rev Entomol* **45**: 449-466.
- Ffrench-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G. 2004. The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends Genet* **20**: 163-170.
- Field LM, Blackman RL, Tyler-Smith C, Devonshire a L. 1999. Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem J* **339** (Pt 3): 737-42.
- Field LM, Devonshire AL, Ffrench-Constant RH, Forde BG. 1989. Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.). *FEBS Lett* **243**: 323-327.
- Field ML, Blackman RL. 2003. Insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer): chromosome location and epigenetic effects on esterase gene expression in clonal lineages. *Biol J Linn Soc* **79**: 107-113.
- Fire a, Xu S, Montgomery MK, Kostas S a, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fossog Tene B, Poupardin R, Costantini C, Awono-Ambene P, Wondji CS, Ranson H, Antonio-Nkondjio C. 2013. Resistance to DDT in an Urban Setting: Common Mechanisms Implicated in Both M and S Forms of *Anopheles gambiae* in the City of Yaoundé Cameroon. *PLoS One* **8**: e61408.
- Frommer WB. 1995. Heterologous Expression of Genes in Bacterial, Fungal, Animal, and Plant Cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **46**: 419-444.
- Gao C-F, Ma S-Z, Shan C-H, Wu S-F. 2014. Thiamethoxam resistance selected in the western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae): Cross-resistance patterns, possible biochemical mechanisms and fitness costs analysis. *Pestic Biochem Physiol* **114**: 90-96.
- Georghiou G. 1990. Overview of insecticide resistance. *ACS Symp Ser* **421**: 18-41.
- Georghiou G., Taylor CE. 1986. Factors influencing the evolution of resistance. In *Pesticide resistance: Strategies and Tactics for Managment*, p. 157-169.
- Grant DF, Hammock BD. 1992. Genetic and molecular evidence for a trans-acting regulatory locus controlling glutathione S-transferase-2 expression in *Aedes aegypti*. *Mol Gen Genet* **234**: 169-176.
- Green CA, Gass RF, Munstermann LE, Baimai V. 1990. Population genetic evidence for two species in *Anopheles minimus* in Thailand. *Med Vet Entomol* 25-34.

- Griffiths UK, Santos AC, Nundy N, Jacoby E, Matthias D. 2011. Incremental costs of introducing jet injection technology for delivery of routine childhood vaccinations: Comparative analysis from Brazil, India, and South Africa. *Vaccine* **29**: 969-975.
- Grigoraki L, Lagnel J, Kioulos I, Kampouraki A, Morou E, Labbé P, Weill M, Vontas J. 2015. Transcriptome Profiling and Genetic Study Reveal Amplified Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance, in the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* **9**: 17.
- Guzov VM, Unnithan GC, Chernogolov, A.A. Feyereisen R. 1998. CYP12A1, a mitochondrial cytochrome P450 from the housefly. *Arch Biochem Biophys* **359**: 231-240.
- Harbach RE. 2007. The Culicidae (Diptera): A review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* **638**: 591-638.
- Hardstone MC, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Scott JG. 2010. Use of isogenic strains indicates CYP9M10 is linked to permethrin resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Insect Mol Biol* **19**: 717-726.
- Hardstone MC, Leichter C a., Scott JG. 2009. Multiplicative interaction between the two major mechanisms of permethrin resistance, kdr and cytochrome P450-monooxygenase detoxification, in mosquitoes. *J Evol Biol* **22**: 416-423.
- Harris a. F, Rajatileka S, Ranson H. 2010. Pyrethroid Resistance in *Aedes aegypti* from Grand Cayman. *Am J Trop Med Hyg* **83**: 277-284.
- Hauerland NH, Bowers WS. 1986. Binding of insecticides to lipophorin and arylphorin, two hemolymph proteins of *Heliothis zea*. *Arch Insect Biochem Physiol* **3**: 87-96.
- Heidari R, Devonshire AL, Campbell BE, Dorrian SJ, Oakeshott JG, Russell RJ. 2005. Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by in vitro mutagenesis. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 597-609.
- Hemingway J, Beaty BJ, Rowland M, Scott TW, Sharp BL. 2006. The Innovative Vector Control Consortium: improved control of mosquito-borne diseases. *Trends Parasitol* **22**: 308-12.
- Hemingway J, Field L, Vontas J. 2002. An overview of insecticide resistance. *Science* **298**: 96-97.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* **34**: 653-65.
- Hemingway J, Karunaratne SH. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. *Med Vet Entomol* **12**: 1-12.

- Hick C a, Field LM, Devonshire a L. 1996. Changes in the methylation of amplified esterase DNA during loss and reselection of insecticide resistance in peach-potato aphids, *Myzus persicae*. *Insect Biochem Mol Biol* **26**: 41-47.
- Holt R, Subramanian G, Halpern A, Sutton G, Charlab R, Nusskern D, Wincker P, Clark A, Ribeiro J, Wides R, et al. 2002. The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**: 129-149.
- Hoy MA. 2003. *Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications*.
- Hu Z, Du Y, Nomura Y, Dong K. 2011. A sodium channel mutation identified in *Aedes aegypti* selectively reduces cockroach sodium channel sensitivity to type I, but not type II pyrethroids. *Insect Biochem Mol Biol* **18**: 1199-1216.
- Huang F-F, Chai C-L, Zhang Z, Liu Z-H, Dai F-Y, Lu C, Xiang Z-H. 2008. The UDP-glucosyltransferase multigene family in *Bombyx mori*. *BMC Genomics* **9**: 563.
- Huch S, Nissan T. 2014. Interrelations between translation and general mRNA degradation in yeast. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**: 747-763.
- Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O' Neill SL. 2011. Wolbachia and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep* **12**: 508-518.
- Jaenisch R, Bird A. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* **33 Suppl**: 245-254.
- Jansen CC, Beebe NW. 2010. The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect* **12**: 272-279.
- Jones CM, Liyanapathirana M, Agossa FR, Weetman D, Ranson H, Donnelly MJ, Wilding CS. 2012. Footprints of positive selection associated with a mutation (N1575Y) in the voltage-gated sodium channel of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 6614-6619.
- Juneja P, Osei-Poku J, Ho YS, Ariani C V., Palmer WJ, Pain A, Jiggins FM. 2014. Assembly of the Genome of the Disease Vector *Aedes aegypti* onto a Genetic Linkage Map Allows Mapping of Genes Affecting Disease Transmission. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: 8.
- Kamareddine L. 2012. The biological control of the malaria vector. *Toxins (Basel)* **4**: 748-767.
- Kamrin M. 1997. *Pesticides Profiles : Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. CRC Press.
- Karunaratne SH, Jayawardena KG, Hemingway J, Ketterman a J. 1993. Characterization of a B-type esterase involved in insecticide resistance from the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J* **294 (Pt 2)**: 575-579.
- Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, Tomita T. 2014. Mechanisms of Pyrethroid Resistance in the Dengue Mosquito Vector, *Aedes aegypti*: Target Site Insensitivity, Penetration, and Metabolism. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: 23.

- Kawada H, Higa Y, Komagata O, Kasai S, Tomita T, Nguyen TY, Luu LL, Sánchez R a P, Takagi M. 2009. Widespread distribution of a newly found point mutation in voltage-gated sodium channel in pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* populations in Vietnam. *PLoS Negl Trop Dis* **3**: 1-7.
- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. 2013. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* **14**: R36.
- Kistler KE, Voss hall LB, Matthews BJ. 2015. Genome Engineering with CRISPR-Cas9 in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Rep* **11**: 51-60.
- Kondrashov F a. 2012. Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. *Proc R Soc B Biol Sci* 5048-5057.
- Labbe P, Berthomieu a., Berticat C, Alout H, Raymond M, Lenormand T, Weill M. 2007. Independent Duplications of the Acetylcholinesterase Gene Conferring Insecticide Resistance in the Mosquito *Culex pipiens*. *Mol Biol Evol* **24**: 1056-1067.
- Lamacchia M, Clayton JR, Wang-sattler R, Steinmetz LM, Levashina EA, Blandin SA. 2013. *Malaria*. **923**: 161-176.
- Le Goff G, Boundy S, Daborn PJ, Yen JL, Sofer L, Lind R, Sabourault C, Madi-Ravazzi L, Ffrench-Constant RH. 2003. Microarray analysis of cytochrome P450 mediated insecticide resistance in *Drosophila*. *Insect Biochem Mol Biol* **33**: 701-708.
- Lepoivre P. 2003. Phytopathologie : bases moléculaires et biologiques des pathosystèmes et fondements des stratégies de lutte. Université De Boeck.
- Lertkiatmongkol P, Jenwitheesuk E, Rongnoparut P. 2011. Homology modeling of mosquito cytochrome P450 enzymes involved in pyrethroid metabolism: insights into differences in substrate selectivity. *BMC Res Notes* **4**: 321.
- Li T, Liu L, Zhang L, Liu N. 2014. Role of G-protein-coupled Receptor-related Genes in Insecticide Resistance of the Mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Sci Rep* **4**: 9.
- Li X, Schuler M a, Berenbaum MR. 2007. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annu Rev Entomol* **52**: 231-53.
- Linss JG, Brito L, Garcia G, Araki A, Bruno R, Lima JB, Valle D, Martins A. 2014. Distribution and dissemination of the Val1016Ile and Phe1534Cys Kdr mutations in *Aedes aegypti* Brazilian natural populations. *Parasit Vectors* **7**: 25.
- Liu N. 2015. Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annu Rev Entomol* **60**: 537-559.
- Liu N, Scott JG. 1996. Genetic analysis of factors controlling high-level expression of cytochrome P450, CYP6D1, cytochrome b5, P450 reductase, and monooxygenase activities in LPR house flies, *Musca domestica*. *Biochem Genet* **34**: 133-148.

Lumjuan N, McCarroll L, Prapanthadara LA, Hemingway J, Ranson H. 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti* White star. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 861-871.

Luplertlop N, Surasombatpattana P, Patramool S, Dumas E, Wasinpiyamongkol L, Saune L, Hamel R, Bernard E, Sereno D, Thomas F, et al. 2011. Induction of a Peptide with Activity against a Broad Spectrum of Pathogens in the *Aedes aegypti* Salivary Gland, following Infection with Dengue Virus. *PLoS Pathog* **7**: e1001252.

Lycett GJ, McLaughlin L a, Ranson H, Hemingway J, Kafatos FC, Loukeris TG, Paine MJ. 2006. Anopheles gambiae P450 reductase is highly expressed in oenocytes and in vivo knockdown increases permethrin susceptibility. *Insect Mol Biol* **15**: 321-327.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. 2004. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* **10**: S98-S109.

Maitra S, Dombrowski SM, Basu M, Raustol O, Waters LC, Ganguly R. 2000. Factors on the third chromosome affect the level of Cyp6a2 and Cyp6a8 expression in *Drosophila melanogaster*. *Gene* **248**: 147-156.

Maitra S, Price C, Ganguly R. 2002. Cyp6a8 of *Drosophila melanogaster*: Gene structure, and sequence and functional analysis of the upstream DNA. *Insect Biochem Mol Biol* **32**: 859-870.

Marcombe S, Mathieu RB, Pocquet N, Riaz M-A, Poupardin R, Sélis S, Darriet F, Reynaud S, Yébakima A, Corbel V, et al. 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS One* **7**: 11.

Marcombe S, Poupardin R, Darriet F, Reynaud S, Bonnet J, Strode C, Brengues C, Yébakima A, Ranson H, Corbel V, et al. 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* **10**: 494.

Martinez-torres D, Chevillon C, Brun-Barale a, Bergé JB, Pasteur N, Pauron D. 1999. Voltage-dependent Na⁺ channels in pyrethroid-resistant *Culex pipiens* L mosquitoes. *Pestic Sci* **55**: 1012-1020.

Martinez-Torres DEA. 1998. Molecular characterization of pyrethroid knockdown (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect Mol Biol* **7**: 179-184.

Martins AJ, Brito LP, Gerlinde J, Linss B, Rivas GB, Machado R, Bruno RV, Bento J, Lima P, Valle D. 2013. Evidence for gene duplication in the voltage gated sodium channel gene of *Aedes aegypti*. *Evol Med public Heal* 148-160.

Matambo TS, Paine MJ, Coetzee M, Koekemoer LL. 2010. Sequence characterization of cytochrome P450 CYP6P9 in pyrethroid resistant and susceptible *Anopheles funestus* (Diptera: Culicidae). *Genet Mol Res* **9**: 554-564.

- Megy K, Emrich SJ, Lawson D, Campbell D, Dialynas E, Hughes DST, Koscielny G, Louis C, MacCallum RM, Redmond SN, et al. 2012. VectorBase: improvements to a bioinformatics resource for invertebrate vector genomics. *Nucleic Acids Res* **40**: D729-D734.
- Mitchell SN, Stevenson BJ, Müller P, Wilding CS, Egyir-Yawson A, Field SG, Hemingway J, Paine MJI, Ranson H, Donnelly MJ. 2012. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 6147-52.
- Morrison TE. 2014. Re-emergence of chikungunya virus. *J Virol*.
- Mortazavi A, Williams B a, McCue K, Schaeffer L, Wold B. 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* **5**: 621-628.
- Mosqueira B, Chabi J, Chandre F, Akogbeto M, Hougard J-M, Carnevale P, Mas-Coma S. 2010. Efficacy of an insecticide paint against malaria vectors and nuisance in West Africa - Part 2: Field evaluation. *Malar J* **9**: 341.
- Mulla MS. 1995. The future of insect growth regulators in vector control. *J Am Mosq Control Assoc* **11**: 269-273.
- Mulla S. 1991. Insect growth regulators for the control of mosquito pests and disease vectors. *Chinese JEntomology Special Pu*: 81-91.
- Müller P, Warr E, Stevenson BJ, Pignatelli PM, Morgan JC, Steven A, Yawson AE, Mitchell SN, Ranson H, Hemingway J, et al. 2008. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet* **4**.
- Muthusamy R, Shivakumar MS. 2015. Susceptibility status of *Aedes aegypti* (L .) (Diptera : Culicidae) to temephos from three districts of Tamil Nadu , India. *J Vector Borne Dis* **52**: 159-165.
- Nabeshima T, Kozaki T, Tomita T, Kono Y. 2003. An amino acid substitution on the second acetylcholinesterase in the pirimicarb-resistant strains of the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem Biophys Res Commun* **307**: 15-22.
- Nabeshima T, Mori A, Kozaki T, Iwata Y, Hidoh O, Harada S, Kasai S, Severson DW, Kono Y, Tomita T. 2004. An amino acid substitution attributable to insecticide-insensitivity of acetylcholinesterase in a Japanese encephalitis vector mosquito, *Culex tritaeniorhynchus*. *Biochem Biophys Res Commun* **313**: 794-801.
- Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M. 2010. RNA-Seq: A Method for Comprehensive Transcriptome Analysis. *Curr Protoc Mol Biol* 1-13.
- Nardini L, Christian RN, Coetzer N, Koekemoer LL. 2013. DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles arabiensis* from South Africa. *Parasit Vectors* **6**: 229.

- Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi Z, Megy K, Grabherr M, et al. 2007. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* **316**: 1718-1723.
- Newcomb RD, Campbell PM, Ollis DL, Cheah E, Russell RJ, Oakeshott JG. 1997. A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 7464-7468.
- Nielsen-Leroux C, Pasquier F, Charles J-F, SinEGre G, Gaven B, Pasteur N. 1997. Resistance to *Bacillus sphaericus* Involves Different Mechanisms in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Larvae. *J Med Entomol* **34**: 321-327.
- Nkya TE, Akhouayri I, Kisinza W, David J-P. 2013. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: facts, evidences and prospects. *Insect Biochem Mol Biol* **43**: 407-16.
- Opyrchal M, Anderson JR, Sokoloski KJ, Wilusz CJ, Wilusz J. 2005. A cell-free mRNA stability assay reveals conservation of the enzymes and mechanisms of mRNA decay between mosquito and mammalian cell lines. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 1321-1334.
- Ortelli F, Rossiter LC, Vontas J, Ranson H, Hemingway J. 2003. Heterologous expression of four glutathione transferase genes genetically linked to a major insecticide-resistance locus from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J* **373**: 957-963.
- Padh H, Rai M. 2001. Expression systems for the production of heterologous proteins. *Curr Sci* **80**.
- Paul A, Harrington LC, Scott JG. 2006. Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **43**: 55-60.
- Pedersen M, Nissen S, Mitarai N, Svenningsen S Lo, Sneppen K, Pedersen S. 2011. The Functional Half-Life of an mRNA Depends on the Ribosome Spacing in an Early Coding Region. *J Mol Biol* **407**: 35-44.
- Peiris, H.T.R. & Hemingway J. 1993. Characterisation and inheritance of elevated esterases in organophosphorus and carbamate insecticide resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Sri Lanka. *Bull Entomol Res* **83**: 127-132.
- Peiris, H.T.R. & Hemingway J. 1990. Mechanisms of insecticide resistance in a temephos selected *Culex quinquefasciatus* strain from Sri-Lanka. *Bull Entomol Res* **80**: 453-457.
- Platt N, Kwiatkowska RM, Irving H, Diabaté A, Dabire R, Wondji CS. 2015. Target-site resistance mutations (kdr and RDL), but not metabolic resistance, negatively impact male mating competitiveness in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Heredity (Edinb)* **10**.
- Pompon D, Louerat B, Bronine A, Urban P. 1996. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. 51-64.

- Poupardin R. 2011a. Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides. *Thèse Univ Joseph Fourier*.
- Poupardin R. 2011b. Interactions gènes-environnement chez les moustiques et leur impact sur la résistance aux insecticides.
- Poupardin R, Riaz MA, Jones CM, Chandor-Proust A, Reynaud S, David J-P. 2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquat Toxicol* **114-115**: 49-57.
- Poupardin R, Srisukontarat W, Yunta C, Ranson H. 2014. Identification of Carboxylesterase Genes Implicated in Temephos Resistance in the Dengue Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: 11.
- Prapanthadara L., Hemingway J., Ketterman AJ. 1995. DDT-resistance in *Anopheles gambiae* Giles from Zanzibar, Tanzania, based on increased DDT-dehydrochlorinase activity of glutathione S-transferase. *Bull Entomol Res* **98**: 267-274.
- Ranson H, Claudianos C, Ortellì F, Abgrall C, Hemingway J, Sharakhova M V, Unger MF, Collins FH, Feyereisen R. 2002. Evolution of supergene families associated with insecticide resistance. *Science* **298**: 179-181.
- Ranson H, Hemingway J. 2005. Mosquito Glutathione Transferases. *Methods Enzymol* **6879**: 226-241.
- Ranson H, Jensen B, Vulule JM, Wang X, Hemingway J, Collins FH. 2000a. Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of Kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect Mol Biol* **9**: 491-7.
- Ranson H, Jensen B, Wang X, Prapanthadara L, Hemingway J, Collins FH. 2000b. Genetic mapping of two loci affecting DDT resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* **9**: 499-507.
- Ranson H, Rossiter L, Ortellì F, Jensen B, Wang X, Roth CW, Collins FH, Hemingway J. 2001. Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Biochem J* **359**: 295-304.
- Reyes-Solis GDC, Saavedra-Rodriguez K, Suarez AF, Black WC. 2014. QTL Mapping of Genome Regions Controlling Temephos Resistance in Larvae of the Mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* **8**: 14.
- Riaz MA, Chandor-Proust A, Dauphin-Villemant C, Poupardin R, Jones CM, Strode C, Régent-Kloeckner M, David J-P, Reynaud S. 2013. Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquat Toxicol* **126**: 326-337.
- Rinkevich FD, Du Y, Dong K. 2013. Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* **106**: 93-100.

- Rivero A, Vézilier J, Weill M, Read AF, Gandon S. 2010. Insecticide Control of Vector-Borne Diseases: When Is Insecticide Resistance a Problem? *PLoS Pathog* **6**: e1001000.
- Riveron JM, Yunta C, Ibrahim SS, Djouaka R, Irving H, Menze BD, Ismail HM, Hemingway J, Ranson H, Albert A, et al. 2014. A single mutation in the GSTe2 gene allows tracking of metabolically-based insecticide resistance in a major malaria vector. *Genome Biol* **15**: R27.
- Rosenheim J, Tabashnik BE. 1990. Evolution of pesticide resistance: interactions between generation time and genetic, ecological, and operational factors. *J Econ Entomol* **83**: 1184-93.
- Ross J. 1995. mRNA Stability in Mammalian Cells. **59**: 423-450.
- Rougeron V, Sam IC, Caron M, Nkoghe D, Leroy E, Roques P. 2015. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J Clin Virol* **64**: 144-152.
- Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Flores AE, Garcia-Luna S, Reyes-Solis GDC, Ranson H, Hemingway J, Black WC. 2014. Differential transcription profiles in *Aedes aegypti* detoxification genes following temephos selection. *Insect Mol Biol* **23**: 199-215.
- Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Flores Suarez A, Fernandez Salas I, Ranson H, Hemingway J, Black WC. 2008. Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* **180**: 1137-52.
- Saavedra-Rodriguez K, Suarez a F, Salas IF, Strode C, Ranson H, Hemingway J, Black WC. 2012. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **21**: 61-77.
- Saavedra-Rodriguez K, Urdaneta-Marquez L, Rajatileka S, Moulton M, Flores a E, Fernandez-Salas I, Bisset J, Rodriguez M, McCall PJ, Donnelly MJ, et al. 2007. A mutation in the voltage-gated sodium channel gene associated with pyrethroid resistance in Latin American *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **16**: 785-98.
- Sánchez-Bayo F. 2012. Insecticides mode of action in relation to their toxicity to non-target organisms. *Jounral Environ Anal Toxicol* **S:4**: 1-11.
- Sarkar M, Baruah I, Srivastava RB, Borkotoki A, Bhattacharyya IK. 2011. High-throughput approach to detection of knockdown resistance (kdr) mutation in mosquitoes, *Culex quinquefasciatus*, based on real-time PCR using single-labelled hybridisation probe/melting curve analysis. *Pest Manag Sci* **67**: 156-161.
- Scholte E-J, Knols BGJ, Samson R a, Takken W. 2004. Entomopathogenic fungi for mosquito control: a review. *J Insect Sci* **4**: 19.
- Schubert L a., Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. 2001. Scurfin (FOXP3) Acts as a Repressor of Transcription and Regulates T Cell Activation. *J Biol Chem* **276**: 37672-37679.

- Scott JG, Yoshimizu MH, Kasai S. 2015. Pyrethroid resistance in *Culex pipiens* mosquitoes. *Pestic Biochem Physiol* **120**: 1-9.
- Singh G, Prakash S. 2014. New Prospective on Fungal Pathogens for Mosquitoes and Vectors Control Technology. *J Mosq Res* **4**: 36-52.
- Srinivasan DG, Brisson J a. 2012. Aphids: A Model for Polyphenism and Epigenetics. *Genet Res Int* **2012**: 1-12.
- Stevenson BJ, Bibby J, Pignatelli P, Muangnoicharoen S, O'Neill PM, Lian L-Y, Müller P, Nikou D, Steven A, Hemingway J, et al. 2011. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: Sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochem Mol Biol* **41**: 492-502.
- Stevenson BJ, Pignatelli P, Nikou D, Paine MJ. 2012. Pinpointing P450s associated with pyrethroid metabolism in the dengue vector, *Aedes aegypti*: developing new tools to combat insecticide resistance. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1595.
- Stone CM, Jackson BT, Foster W a. 2012. Effects of bed net use, female size, and plant abundance on the first meal choice (blood vs sugar) of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Malar J* **11**: 3.
- Strode C, Wondji CS, David J-P, Hawkes NJ, Lumjuan N, Nelson DR, Drane DR, Karunaratne SHPP, Hemingway J, Black WC, et al. 2008. Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 113-23.
- SupYoon K, Symington SB, Hyeock Lee S, Soderlund DM, Marshall Clark J. 2008. Three mutations identified in the voltage-sensitive sodium channel alpha-subunit gene of permethrin-resistant human head lice reduce the permethrin sensitivity of house fly Vssc1 sodium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 296-306.
- Suredj P, Riedl A, Lorena MJ. 1994. Regulation of mRNA Stability in Development. *Annu Rev Genet* **28**: 263-282.
- Syvanen M, Zhou ZH, Wang JY. 1994. Glutathione transferase gene family from the housefly *Musca domestica*. *Mol Gen Genet* **245**: 25-31.
- Tantely ML, Tortosa P, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A, Dehecq JS, Makoundou P, Labbé P, Pasteur N, et al. 2010. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island. *Insect Biochem Mol Biol* **40**: 317-324.
- Tetreau G, Chandor-Proust A, Faucon F, Stalinski R, Akhouayri I, Prud'homme SM, Raveton M, Reynaud S. 2013. Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. *Aquat Toxicol* **140-141**: 389-397.
- Tetreau G, Chandor-Proust A, Faucon F, Stalinski R, Akhouayri I, Prud'homme SM, Régent-Kloeckner M, Raveton M, Reynaud S. 2014. UV light and urban pollution: Bad cocktail for mosquitoes? *Aquat Toxicol* **146**: 52-60.

- Thompson M, Shotkoski F, French-Constant R. 1993. Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Conservation of the gene and resistance associated mutation with *Drosophila*. *FEBS Lett* **325**: 187-190.
- Timoshevskiy V a, Kinney N a, deBruyn BS, Mao C, Tu Z, Severson DW, Sharakhov I V, Sharakhova M V. 2014. Genomic composition and evolution of *Aedes aegypti* chromosomes revealed by the analysis of physically mapped supercontigs. *BMC Biol* **12**: 27.
- Tomita T, Scott JG. 1995. cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem Mol Biol* **25**: 275-283.
- Trapnell C, Williams B a, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. 2011. Transcript assembly and abundance estimation from RNA-Seq reveals thousands of new transcripts and switching among isoforms. *Nat Biotechnol* **28**: 511-515.
- Vaughan a, Hawkes N, Hemingway J. 1997. Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochem J* **325 (Pt 2)**: 359-365.
- Vaughan a, Hemingway J. 1995. Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem* **270**: 17044-17049.
- Vega-Rua a., Zouache K, Girod R, Failloux a.-B, Lourenco-de-Oliveira R. 2014. High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus. *J Virol* **88**: 6294-6306.
- Vontas JG, Small GJ, Hemingway J. 2001. Glutathione-S-transferase as antioxidant defense agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* **357**: 65-72.
- Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J. 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochem J* **362**: 329-337.
- Wallace BD, Redinbo MR. 2013. Xenobiotic-sensing nuclear receptors involved in drug metabolism: a structural perspective. *Drug Metab Rev* **45**: 79-100.
- Wang J., McCommas S., Syvanen M. 1991. Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* **227**: 260-266.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* **10**: 57-63.

- Wei SH., Clark AG., Syvanen M. 2001. Identification and cloning of a key insecticide-metabolizing glutathione S-transferase (MdGST-6A) from a hyper insecticide-resistant strain of the housefly *Musca domestica*. *Insect Biochem Mol Biol* **31**: 1145-1153.
- Wei Y, Xiao Q, Zhang T, Mou Z, You J, Ma W-J. 2009. Differential regulation of mRNA stability controls the transient expression of genes encoding *Drosophila* antimicrobial peptide with distinct immune response characteristics. *Nucleic Acids Res* **37**: 6550-6561.
- Weill M, Berthomieu A, Dubois MP, Pasteur N, Raymond M. 2002. A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and its non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc R Soc B Biol Sci* **269**: 2007-2016.
- Weill M, Malcolm C, Chandre F, Mogensen K, Berthomieu a., Marquine M, Raymond M. 2004. The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* **13**: 1-7.
- WHO. 1998. *Techniques to detect insecticide resistance mechanisms (field and laboratory manual)*. Geneva.
- WHO. 2012. *World Malaria Report 2012*.
- Wilding CS, Smith I, Lynd A, Yawson AE, Weetman D, Paine MJ, Donnelly MJ. 2012. A cis-regulatory sequence driving metabolic insecticide resistance in mosquitoes: Functional characterisation and signatures of selection. *Insect Biochem Mol Biol* **42**: 699-707.
- Wilhelm BT, Landry J-R. 2009. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods* **48**: 249-257.
- Wilson ME, Chen LH. 2015. Tropical, Travel and Emerging Infections. *Curr Infect Dis Rep* **17**: 457.
- Wirth MC, Ferrari J., Georgiou G. 2001. Baseline Susceptibility to Bacterial Insecticides in Populations of *Culex pipiens* Complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean Island of Cyprus. *J Econ Entomol* **94**: 920-928.
- Wondji CS, Irving H, Morgan J, Lobo NF, Collins FH, Hunt RH, Coetzee M, Hemingway J, Ranson H. 2009. Two duplicated P450 genes are associated with pyrethroid resistance in *Anopheles funestus*, a major malaria vector. *Genome Res* **19**: 452-459.
- Wondji CS, Morgan J, Coetzee M, Hunt RH, Steen K, Black WC, Hemingway J, Ranson H. 2007. Mapping a quantitative trait locus (QTL) conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*. *BMC Genomics* **8**: 34.
- Wood O, Hanrahan S, Coetzee M, Koekemoer L, Brooke B. 2010. Cuticle thickening associated with pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Parasit Vectors* **3**: 67.

- Wu Y, Zhang X, Bardag-Gorce F, Robel RC V, Aguilo J, Chen L, Zeng Y, Hwang K, French SW, Lu SC, et al. 2004. Retinoid X receptor alpha regulates glutathione homeostasis and xenobiotic detoxification processes in mouse liver. *Mol Pharmacol* **65**: 550-7.
- Yan G, Chadee DD, Severson DW. 1998. Evidence for genetic hitchhiking effect associated with insecticide resistance in *Aedes aegypti*. *Genetics* **148**: 793-800.
- Yang Y-Y, Liu Y, Teng H-J, Sauman I, Sehnal F, Lee H-J. 2010. Circadian control of permethrin-resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* **56**: 1219-23.
- Yano JK, Wester MR, Schoch G a., Griffin KJ, Stout CD, Johnson EF. 2004. The Structure of Human Microsomal Cytochrome P450 3A4 Determined by X-ray Crystallography to 2.05-Å Resolution. *J Biol Chem* **279**: 38091-38094.
- Yanola J, Somboon P, Walton C, Nachaiwieng W, Prapanthadara L. 2010. A novel F1552/C1552 point mutation in the *Aedes aegypti* voltage-gated sodium channel gene associated with permethrin resistance. *Pestic Biochem Physiol* **96**: 127-131.

Annexe I :

UV light and urban pollution : bad cocktail for mosquitoes?



UV light and urban pollution: Bad cocktail for mosquitoes?



Guillaume Tetreau^{a,b,*}, Alexia Chandor-Proust^{a,1}, Frédéric Faucon^{a,1},
Renaud Stalinski^{a,1}, Idir Akhouayri^{a,1}, Sophie M. Prud'homme^{a,1},
Myriam Régent-Kloeckner^a, Muriel Raveton^a, Stéphane Reynaud^a

^a Laboratoire d'Ecologie Alpine, LECA-UMR 5553, Université de Grenoble 1, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France

^b Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 July 2013

Received in revised form 18 October 2013

Accepted 29 October 2013

Keywords:

Ultraviolet

Polycyclic aromatic hydrocarbon

Insecticides

Bioassay

Aedes aegypti

Enzymatic activities

ABSTRACT

Mosquito breeding sites consist of water pools, which can either be large open areas or highly covered ponds with vegetation, thus with different light exposures combined with the presence in water of xenobiotics including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) generated by urban pollution. UV light and PAHs are abiotic factors known to both affect the mosquito insecticide resistance status. Nonetheless, their potential combined effects on the mosquito physiology have never been investigated. The present article aims at describing the effects of UV exposure alongside water contamination with two major PAH pollutants (fluoranthene and benzo[a]pyrene) on a laboratory population of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*.

To evaluate the effects of PAH exposure and low energetic UV (UV-A) irradiation on mosquitoes, different parameters were measured including: (1) The PAH localization and its impact on cell mortality by fluorescent microscopy; (2) The detoxification capacities (cytochrome P450, glutathione-S-transferase, esterase); (3) The responses to oxidative stress (Reactive Oxygen Species–ROS) and (4) The tolerance of mosquito larvae to a bioinsecticide (*Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*–Bti) and to five chemical insecticides (DDT, imidacloprid, permethrin, propoxur and temephos).

Contrasting effects regarding mosquito cell mortality, detoxification and oxidative stress were observed as being dependent on the pollutant considered, despite the fact that the two PAHs belong to the same family. Moreover, UV is able to modify pollutant effects on mosquitoes, including tolerance to three insecticides (imidacloprid, propoxur and temephos), cell damage and response to oxidative stress. Taken together, our results suggest that UV and pollution, individually or in combination, are abiotic parameters that can affect the physiology and insecticide tolerance of mosquitoes; but the complexity of their direct effect and of their interaction will require further investigation to know in which condition they can affect the efficacy of insecticide-based vector control strategies in the field.

Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Freshwater ecosystems provide goods and services of critical importance to human societies, but are among the most heavily altered ecosystems due to the accumulation of pollutants carried, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), personal care products or agrochemicals (Zhang et al., 2010). Among widespread pollutants, PAHs are of particular importance due to their systematic occurrence from wetlands to urban areas (Jurado et al., 2012; Zhang et al., 2010). Benzo[a]pyrene (BaP) is one of the most studied PAHs, due to its known carcinogenicity in mammals and fish (Denissenko et al., 1996; Lee

and Shim, 2007), although fluoranthene (Fluo) is more abundant than BaP in aquatic media (Cailleaud et al., 2007; Fernandes et al., 1997). Despite the lack of study on its ability to react with DNA, fluoranthene is presumed to be less genotoxic than BaP (Wessel et al., 2012). The PAH toxicity in living organisms is commonly attributed to PAH biotransformation into secondary highly toxic reactive metabolites by cytochrome P450 monooxygenase activities (Reynaud and Deschaux, 2006; Xue and Warshawsky, 2005). The difference in toxicity between BaP and fluoranthene is partly explained by the lower affinity of fluoranthene to the aryl hydrocarbon receptor (AhR), which regulates such biotransformation activities (Machala et al., 2001), and to the lack of structural bay region in fluoranthene. Indeed, PAH molecules containing a bay region, like BaP, are preferentially oxidized in animals to bay region diol epoxides that are known to be highly reactive molecules, and thus biologically active metabolites (Wessel et al., 2012). In addition to biotransformation, photolysis constitutes a

* Corresponding author. Tel.: +1315 787 2476; fax: +1315 787 2326.

E-mail address: guillaume.tetreau@gmail.com (G. Tetreau).

¹ Equal contributions.

major degradation pathway for PAHs because of their chemical structure, which absorbs in the visible (400–700 nm) and the ultraviolet (280–400 nm) wavelengths (Arfsten et al., 1996; Haritash and Kaushik, 2009). PAH photodegradation may lead to the production of metabolites, which are more toxic than their parent compounds (Arfsten et al., 1996). Previous works demonstrated that PAH toxicity in the presence of sunlight is enhanced in bacteria, fish, crustaceans and other animals (Arfsten et al., 1996; Lampi et al., 2006). Moreover, UV irradiation on its own is known to generate reactive oxygen species (ROS), which are chemically reactive molecules (hydroxyl radical, superoxide anion, singlet oxygen) able to seriously damage cell structures, DNA, lipids and proteins, generally leading to cell apoptosis (Dahms and Lee, 2010; Fu et al., 2012; Mohan et al., 2003). Co-exposure to PAHs and UV light is known to induce a higher production of ROS, which may damage DNA and cell membranes, and enhance the covalent binding of some PAHs to DNA (Arfsten et al., 1996).

Mosquitoes are considered as the most dangerous animals worldwide responsible for millions of human deaths every year due to their capacity to transmit major human diseases, such as malaria, dengue or yellow fever (Gubler, 1998; Ross, 1901; Scott, 2007; Tomori, 2004). Current control measures largely rely on insecticides to limit mosquito populations, thereby reducing disease transmission (Dick et al., 2012). Most of the mosquito life cycle occurs in aquatic ecosystems, in which the four larval stages develop. Such breeding sites may be highly contrasted natural or man-made breeding sites, such as agricultural fields or extensively urbanized sites with an important UV gradient combined with the presence of pollutants (Jurado et al., 2012; Zhang et al., 2010). Of great importance, PAHs, more specifically BaP and fluoranthene, were previously shown to induce metabolic changes in mosquitoes leading to an increased tolerance to chemical insecticides with no significant direct toxicity (Poupardin et al., 2008, 2012; Riaz et al., 2009). Additionally, a recent article showed that exposure of mosquitoes to UV-A during their entire larval development induced an increase in detoxification enzymes activities and gene expression, leading to a contrasting pattern of tolerance toward chemical and biological insecticides (Tetreau et al., 2013). It highlights the potentially strong impact of sunlight exposure on the efficacy of insecticide-based mosquito control strategies.

Although mosquitoes are exposed *in natura* to both factors, PAHs and UV, no study on the effect of UV light combined to PAH exposure on insecticide mosquito susceptibility has been performed hitherto. By using the yellow fever mosquito vector *Aedes aegypti* as a model organism, we tested whether the combined exposure to UV-A light and to different PAHs affect the physiology of mosquito larvae (cell toxicity, detoxification enzyme activities and oxidative stress) as well as mosquito tolerance to insecticides. After UV and/or PAHs exposure, mosquito susceptibility to six major insecticide classes, namely the organochlorine DDT, the organophosphate temephos, the pyrethroid permethrin, the carbamate propoxur, the neonicotinoid imidacloprid and the bioinsecticide *Bti* was assessed.

2. Material and methods

2.1. Mosquito strain and experimental design

The laboratory *A. aegypti* strain “Bora-Bora”, which is susceptible to all insecticides, was used. After egg hatching, larvae were reared in tap water and fed with a standard amount of larval food (hay pellets) at a temperature of 27 °C with 80% relative humidity and a 15/9 h light/dark period. Two thousand 3-day-old larvae (early 3rd instar) were exposed for 24 h to 0.5, 5 and 50 µg L⁻¹ of fluoranthene or benzo[a]pyrene (BaP) or to a 1:1 wt:wt mix of both

(0.25, 2.5 and 25 µg L⁻¹ of each pollutant for a final concentration of 0.5, 5 and 50 µg L⁻¹ of total PAHs, respectively). These concentrations have been chosen to reflect a low (0.5 µg L⁻¹), moderate (5 µg L⁻¹) and high (50 µg L⁻¹) water pollution by fluoranthene and a low (0.5 µg L⁻¹) and high (5 and 50 µg L⁻¹) water pollution by BaP (Dortch et al., 2008; Pitt et al., 1993; WHO, 1998). Larvae were then exposed (during the last hour of PAH exposure) for one hour to UV-A ($\lambda = 365$ nm) at 70 W m⁻² (Vilbert–Lourmat 115 L 15 W lamp), representing a very low UV-index of 1.14 (calculated according to the standardized ISO/CIE procedure; correction factor for 365 nm: 0.000407) prior to enzymatic activity measurements. Control samples consisted of larvae unexposed to UV, pollutants or both parameters.

2.2. PAH localization and cell mortality detection

Fluoranthene and BaP are known to become fluorescent under UV light. In order to determine the PAH localization within mosquito tissues, larvae exposed to PAHs were observed under a stereo zoom microscope (SZX16, Olympus) with normal light and/or epifluorescence (excitation: 340–380 nm, emission: 450–490 nm). Since Malpighian tubules are auto-fluorescent, only crystallized PAH and thus non-metabolized one can be observed by this technique. In order to detect cell mortality potentially induced by PAHs and UV exposure, 20 larvae from each condition were immersed in a mixture of 40 µg mL⁻¹ propidium iodide (PI, Sigma Aldrich) for 3 h in the dark, and then washed and placed in distilled water for 1 h. The larvae were observed under normal light and/or epifluorescence (excitation: 450–490 nm, emission 510–540 nm), allowing the detection of PI, which incorporates into nuclei of dead cells.

2.3. Enzymatic activities

For each condition, 800 larvae were homogenized by a glass–teflon homogenizer on ice (10 strokes) in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.5 mM DTT, 2 mM EDTA and 0.8 mM PMSF. Three replicates were used for each condition. The homogenate was then centrifuged at 10,000g for 20 min at 4 °C and the resulting supernatant was ultracentrifuged at 100,000g for 1 h at 4 °C. The pellet (microsomal fraction) was resuspended in 500 µL of 0.05 M phosphate buffer and used to measure cytochrome P450 monooxygenases activity. The supernatant (cytosolic fraction) was used to measure all other enzymatic activities.

P450 activities were measured using 7-ethoxyresorufin (EROD, Sigma Aldrich) as a substrate, as described by Reynaud et al. (2002) with modifications for microplate measurements. The activity was measured at 30 °C with a sample containing 20 µg microsomal proteins, Glucose-6-Phosphate (G6P) (5 mM), NADPH (0.1 mM), G6P dehydrogenase (1 U mL⁻¹), 7-ethoxyresorufin (5 µM), and phosphate buffer (50 mM Na₂PO₄; pH 7.4) in a final volume of 200 µL. Fluorescence (excitation 537 nm; emission 583 nm) was recorded every 30 s for 40 min in a Varioskan Flash Multimode Reader (multiplate reader; Thermo Scientific).

Glutathione-S-transferase (GST) activity was measured using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma Aldrich) as a substrate, as described by Riaz et al. (2009) with slight modifications. The reaction mixture contained 20 µg protein from the cytosolic fraction, 1.3 mM reduced glutathione (Sigma Aldrich) and 1 mM CDNB in 0.1 M phosphate buffer; pH 6.9. The absorbance of the reaction solution at 340 nm was measured after 1 min.

Activities of α -esterases and β -esterases were measured using α -naphthyl acetate and β -naphthyl acetate as substrates (Sigma Aldrich), respectively, as described by Poupardin et al. (2008).

The effect of UV and PAH-exposure on detoxification enzyme activities was analyzed using a Wilcoxon test ($N=3$) performed on R 2.15.2 software (R Development Core Team, 2007).

2.4. ROS measurement

The amount of reactive oxygen species (ROS) was assessed by measuring the chemical reduction of the redox dye nitroblue tetrazolium (NBT). (Sigma Aldrich), as described by Reynaud et al. (2001) with modifications. This technique allowed the precise quantification of O_2^- production by the extraction of formazan produced in larvae by NBT reduction. Twenty larvae were added to 1 mL of a 1 mg L^{-1} NBT solution for 2 h in the dark at room temperature. Larvae were washed twice in ethanol, air dried and the formazan produced was then dissolved in $50\text{ }\mu\text{L}$ KOH (2 M) and $75\text{ }\mu\text{L}$ DMSO. The turquoise-blue colored solution was read at 630 nm. The effect of UV and PAH exposure on ROS production was analyzed using a Wilcoxon test ($N=3$) performed on R 2.15.2 software (R Development Core Team, 2007).

2.5. Bioassay

Bioassay was performed under normal light on 4-day-old larvae (late 3rd instar) pre-exposed to $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ fluoranthene or BaP or both ($25\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of fluoranthene + $25\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of BaP) for 24 h and to a final 1 h UV exposure. Diagnostic concentrations were designed in order to get about 50–70% larval mortality in controls (without UV and without xenobiotics). $78\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, $300\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, $2.5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$, $500\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ and $6\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of *Bti* (Vectobac WG, Bayer), DDT (Sigma Aldrich), imidacloprid (Sigma Aldrich), permethrin (Sigma Aldrich), propoxur (Sigma Aldrich) and temephos (Sigma Aldrich) were used, respectively. All initial solutions of PAHs and chemical insecticides were prepared in absolute ethanol while the solution of *Bti* was prepared in tap water following manufacturer's instructions. Bioassay consisted in 20 larvae in 50 mL of insecticide solution or tap water (control) according to standard bioassay procedures (WHO, 2005). Ten replicates were used for every insecticide and condition. Larval mortality was monitored after 24-h exposure to the insecticide. For imidacloprid bioassay, an additional 24 h recovery in tap water was performed before monitoring mortality. The effect of UV and PAH exposure on larval mortality was tested by a linear model followed by multiple pairwise comparisons of means (Tukey's Honestly Significant Difference test) performed on R 2.15.2 software (R Development Core Team, 2007).

3. Results

3.1. Fate and toxicity of PAHs in mosquitoes

3.1.1. Fate of PAHs in mosquito larvae

Exposure of mosquitoes to $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ fluoranthene led to a crystallization of the PAH and/or its metabolites in the Malpighian tubules (MTs), primary insect secretory organs (Fig. 1). Crystallization of fluoranthene was not visible when larvae were exposed to lower concentrations (0.5 and $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) (Figure S1). However, exposure of larvae to $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ of BaP did not induce any crystallization, but a slight higher fluorescence in the entire MTs, suggesting a solubilization of the PAH and/or its metabolites in the MT lumen (Fig. 1). Mixing BaP and fluoranthene resulted in PAH crystallization, likely fluoranthene, in the MTs as described above (Fig. 1). UV exposure did not induce any modification of the tissue repartition and crystallization of PAHs (data not shown).

3.1.2. Malpighian tubule cell mortality induced by PAHs and UV

Exposing the larvae to UV light did not trigger any noticeable cell mortality, whereas larval exposure to both UV and PAHs

induced high cell mortality in the MTs (Table 1, Fig. 2). No mortality was observed when larvae were exposed to fluoranthene, regardless of the concentration used (Table 1). Nevertheless, the addition of 1 h UV exposure to a fluoranthene exposure (at $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ and $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) led to high cell mortality in the MTs (Table 1, Fig. 2). However, BaP induced cell mortality without UV exposure at $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ and $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ and the exposure to UV for 1 h seems to induce only a slight increase in cell mortality (Table 1, Figure S2). Lastly, no cell mortality could be observed when larvae were exposed to a mixture of fluoranthene and BaP (1:1 wt/wt), regardless of PAH concentration and UV exposure (Table 1, Fig. 2).

3.2. Impact of UV and PAHs on enzymatic activities

Alpha and beta-esterase activities were both induced by fluoranthene and BaP (individually or as a mixture) (Fig. 3A, B). The exposure to PAHs seems to induce a concentration-dependent increase of esterase activities, ranging from 7 to 36%. An exclusive UV exposure also induced a two-fold increase in α - and β -esterase activities. However, UV irradiation did not lead to a clear PAH concentration-dependent induction of α - and β -esterases activities, suggesting a distinct non-cumulative effect of the two parameters on esterase activities.

Several detoxification enzyme activities were measured in larvae exposed to UV and PAHs. P450 activities were significantly lower than the control at $0.5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ PAHs but increased at $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ PAHs (Fig. 3C). In addition, UV exposure generally induced a significant decrease in P450 activity for each condition, ranging from 37 to 57% compared to controls.

GST activities were globally not significantly altered by the pollutants but exposure to UV alone and to both PAH and UV significantly increased GST activities from 8 to 38% (Fig. 3D). Of note, exposure to $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ fluoranthene and UV exhibited a peak of GST induction (40% relative to unexposed larvae).

Finally, the mixture of fluoranthene and BaP did not significantly alter the enzymatic activities compared to exposing to a single PAH for all enzymes considered (Fig. 3).

3.3. Impact of UV and PAHs on ROS production

Increasing PAH concentrations led to a decrease in the amount of ROS produced, especially for BaP and the mix of two PAHs, with or without UV exposure (Fig. 4A). In larvae unexposed to PAHs, UV exposure induced a significant 80% increase of the amount of ROS, whereas this effect was only visible for four out of the nine conditions of PAH exposure. Interestingly, a negative correlation between P450 activities and the amount of ROS was evidenced ($R^2=0.465$; $\rho=-0.816$; $p=0.0004$) (Fig. 4B).

3.4. Impact of UV and PAHs on insecticide susceptibility

Mosquito susceptibility to six different insecticides widely used in vector control was assessed following simultaneous exposure to UV light and the two PAHs individually or in mixture. Larval susceptibility to *Bti*, DDT and permethrin was not affected by PAHs and UV exposure (Fig. 5A, B, D). However, larvae were significantly more tolerant to imidacloprid and propoxur after a combined exposure to UV and the two PAHs compared to an exclusive UV exposure (Fig. 5C, E). Nevertheless, in absence of PAHs, 1 h of UV exposure induced an increased larval susceptibility to propoxur (Fig. 5E). Lastly, exclusive exposures to UV or PAHs induced a significant increase in the tolerance to temephos, but this increase was not significant upon simultaneous UV/PAH exposure (Fig. 5F).

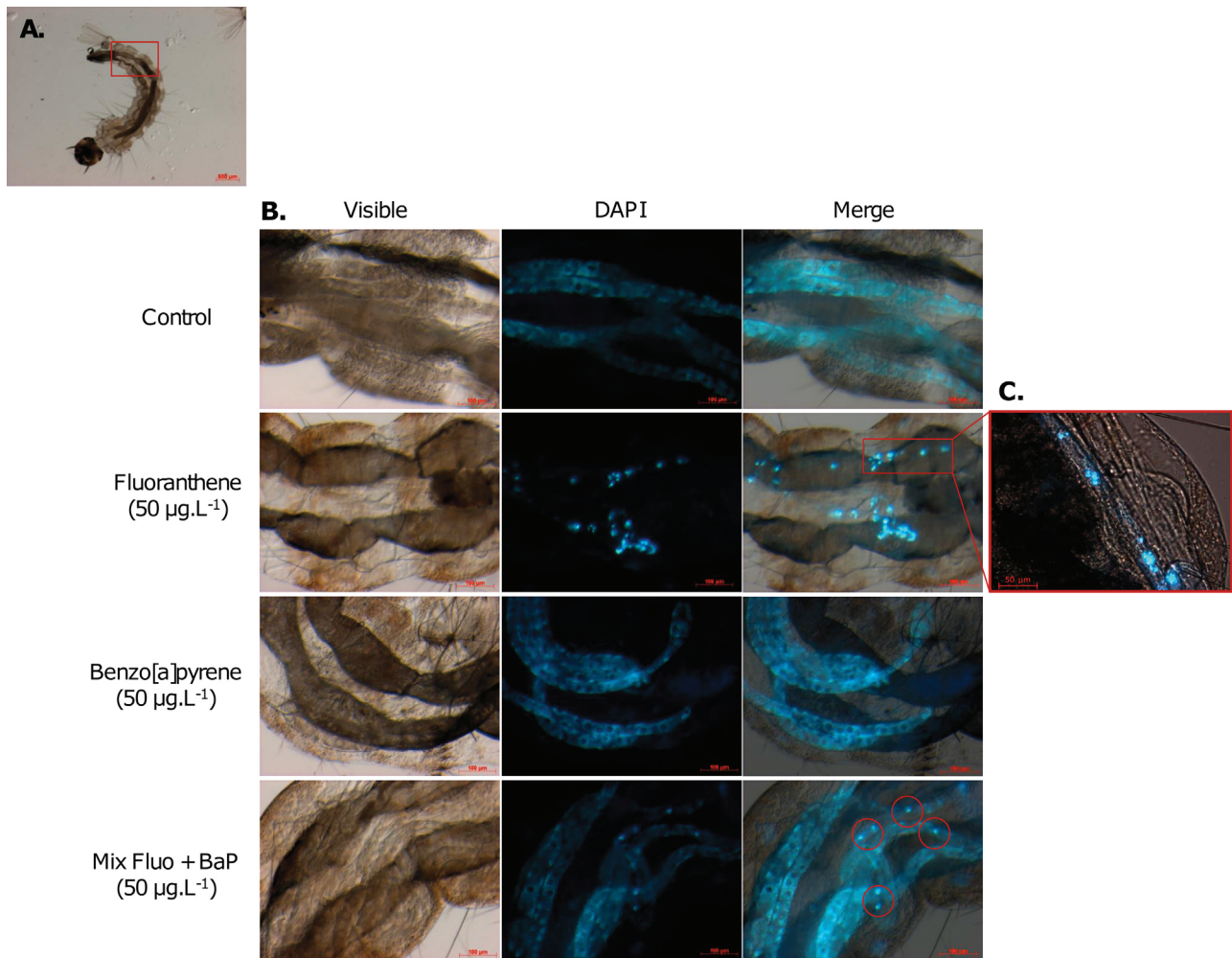


Fig. 1. Localization of PAHs in mosquito larvae. Focus in the posterior region of the larvae (indicated by a red square in A) where the Malpighian tubules are located have been performed for each of the 12 conditions presented (B). C. A specific zoom on Malpighian tubules has been done for the effect of fluoranthene ($50 \mu\text{g L}^{-1}$). Larvae exposed to $50 \mu\text{g L}^{-1}$ PAHs, without UV exposure, were observed under a stereo zoom microscope with normal light ('Visible'), epifluorescence (excitation: 340–380 nm, emission: 450–490 nm, 'DAPI') or both simultaneously ('Merge'). A diffused blue color in MT specifically indicates the presence of soluble PAHs, while intense fluorescent spots indicate crystallization of PAHs. A background fluorescence of the MT is visible as a light blue color (Control).251658240.

4. Discussion

In several organisms, UV exposure is detrimental to the cell metabolism by inducing oxidative stress, thereby affecting cell survival (Dahms and Lee, 2010; Sang et al., 2012). However, in mosquitoes, UV-exposed larvae show an enhanced survival to chemical insecticides (Tetreau et al., 2013). Moreover, pollutants such as PAHs can also have beneficial or detrimental impacts on living organisms by either activating detoxification enzyme-coding genes, which modify the mosquito insecticide susceptibility (Poupardin et al., 2008, 2012; Riaz et al., 2009), or inducing ROS production leading to cell death (Burke and Wei, 2009; Fu et al., 2012). The purpose of this article was to investigate the combined effect

of PAHs and UV light exposure on mosquitoes, from molecular to individual levels. One may expect that application of both factors to mosquitoes could have synergistic effects on all the parameters tested (tolerance to insecticide, detoxification enzyme activities, oxidative stress, cell mortality), but our results revealed far less trivial biological outcomes.

Firstly, regarding the fate of the pollutants in mosquito tissues, we showed that, at the highest concentration, fluoranthene crystallized in the Malpighian tubules (MTs) but not BaP. MTs are major insect organs responsible for insect osmoregulation and for the metabolism and excretion of xenobiotics (Davies et al., 2012). The different behaviors of these two PAHs could be explained by their distinct ability to induce xenobiotic-metabolizing enzymes, with

Table 1
Effect of UV and PAH exposure on Malpighian tubules (MT) cell mortality.

Condition	Control	Fluoranthene			Benzo[a]pyrene			Mix Fluo + BaP		
		$0.5 \mu\text{g L}^{-1}$	$5 \mu\text{g L}^{-1}$	$50 \mu\text{g L}^{-1}$	$0.5 \mu\text{g L}^{-1}$	$5 \mu\text{g L}^{-1}$	$50 \mu\text{g L}^{-1}$	$0.5 \mu\text{g L}^{-1}$	$5 \mu\text{g L}^{-1}$	$50 \mu\text{g L}^{-1}$
–UV	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
+UV	–	–	+	+	–	+	+	–	–	–

Note: '+' indicates that cell mortality has been observed in Malpighian tubules while '–' indicates that no visible cell mortality was noticed under microscope. Fluoranthene, Fluo; Benzo[a]pyrene, BaP.

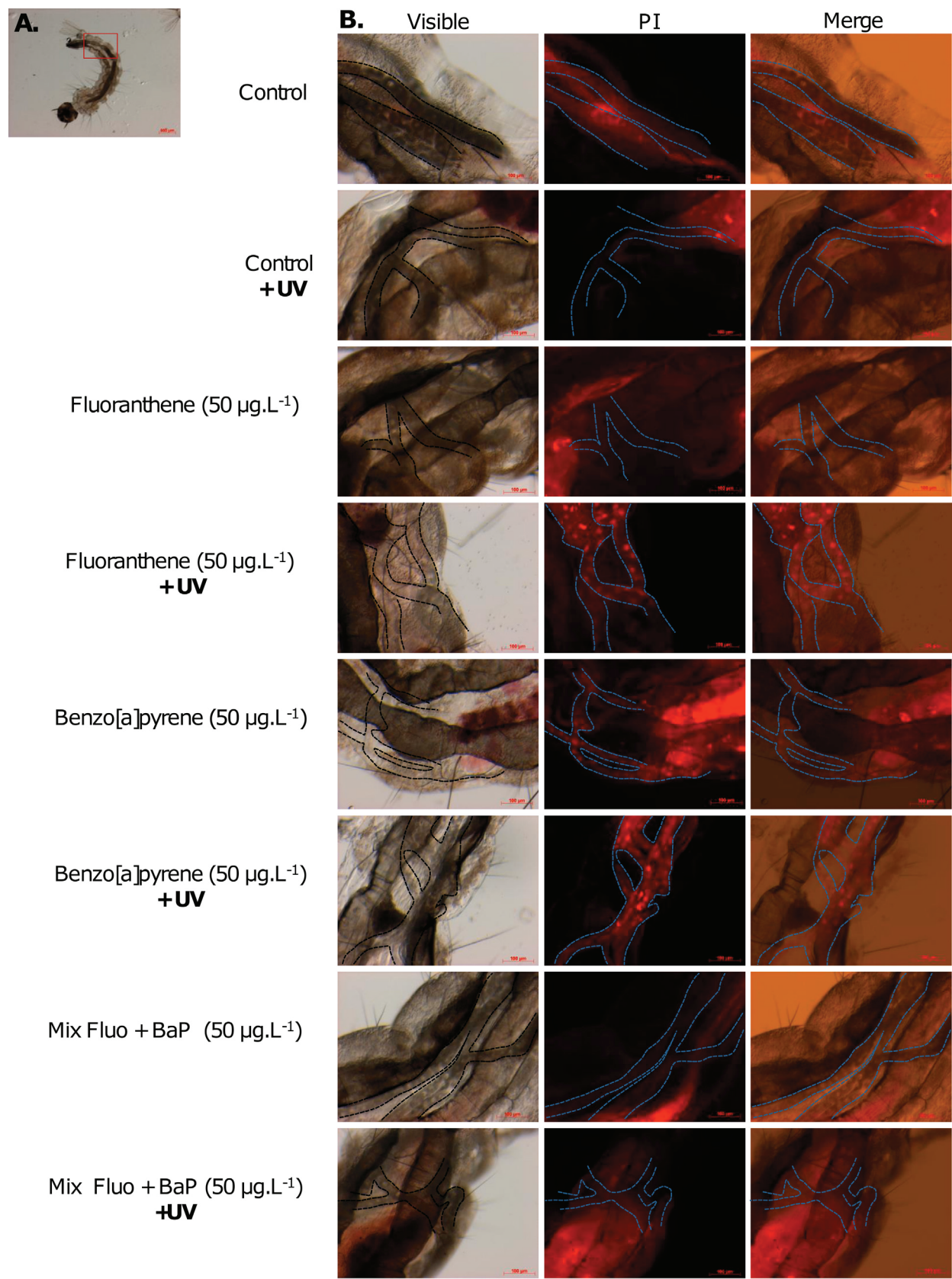


Fig. 2. Effect of UV and PAH exposure on cell and tissue mortality. Focus in the posterior region of the larvae (indicated by a red square in A) where the Malpighian tubules are located have been performed for each of the 24 conditions presented (B). Larvae exposed to PAHs, with UV (+UV) or without UV (–UV) exposure, were treated with propidium iodide and observed under a stereo zoom microscope with normal light (‘Visible’), epifluorescence (excitation: 450–490 nm, emission 510–540 nm, ‘PI’) or both simultaneously (‘Merge’). Intense red spots indicate staining of nuclei in dead cells. Limits of the MT are indicated by dotted lines.251658240.

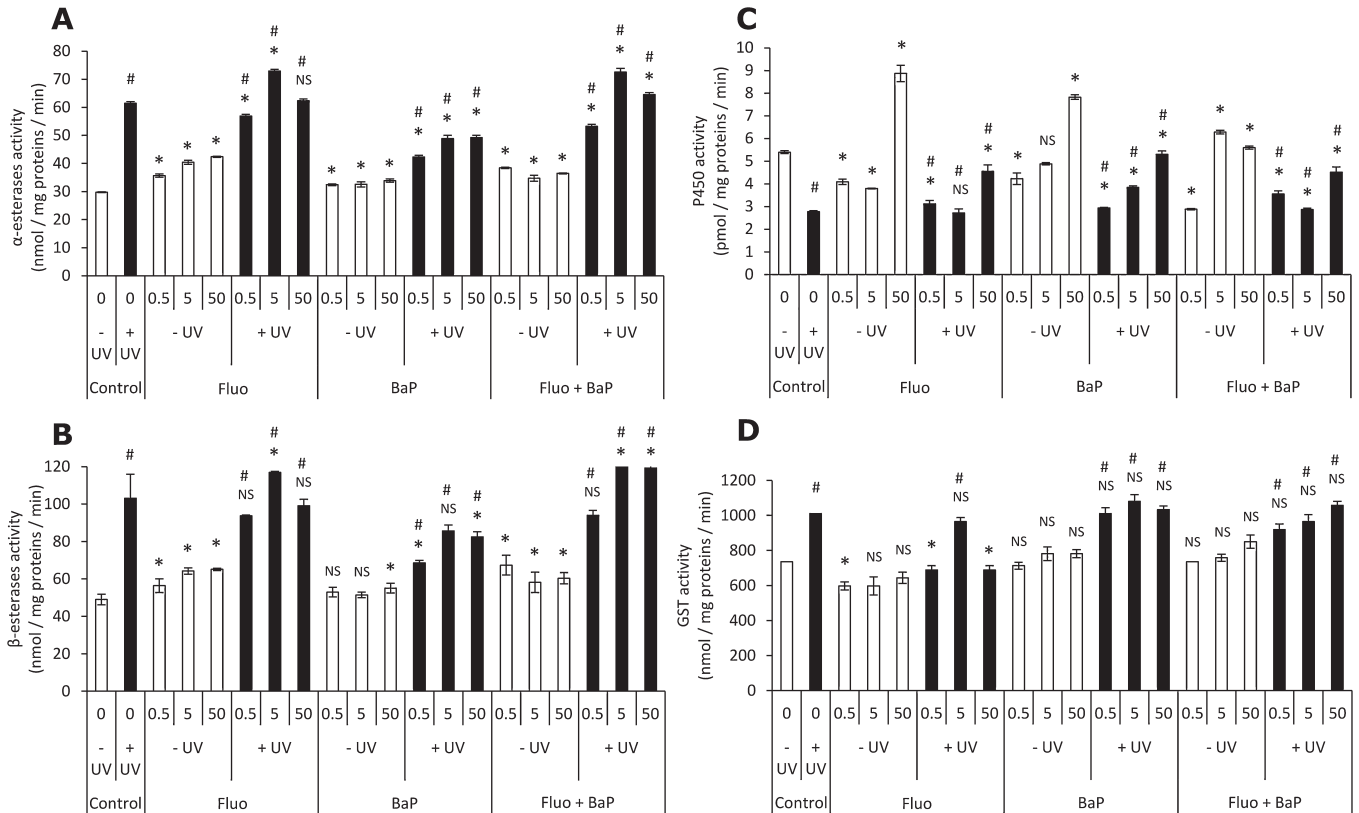


Fig. 3. Effect of UV and PAH exposure on detoxification enzyme activities. α -esterase (A), β -esterase (B), P450 (C), and GST (D) activities after exposure to fluoranthene (Fluo), benzo[a]pyrene (BaP), both (Fluo + BaP) or without PAH exposure (Control), with UV exposure (+UV, black bars) or without (–UV, white bars). For each condition of PAH exposure, significant differences relative to their corresponding control are indicated by “*” above bars, while non-significant differences are indicated by “NS”. The significant effect of UV exposure on the enzymatic activity (e.g. between fluoranthene at 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ exposed to UV and non-exposed to UV) is indicated by “#” above black bars. 251658240.

BaP showing more potency, thereby being differentially metabolized. Indeed, fluoranthene has been reported to weakly induce monooxygenase enzymes in mammalian systems, at least 100 times less compared to BaP (Huderson et al., 2010). Considering that this pattern is only observed for the highest concentration of fluoranthene in mosquito MTs, crystallization may result from a saturation of the detoxification system capacity, leading to an accumulation of fluoranthene in the MTs.

Interestingly, in the absence of UV, fluoranthene had no deleterious effect on cell mortality in larvae, while the addition of UV induced strong cell mortality in MTs, even at low concentrations. Two different but complementary phenomena may be involved: (1) fluoranthene is photosensitized following exposure to UV, leading to direct cell damage and (2) photosensitized fluoranthene is known to induce the production of ROS, which are highly cytotoxic (Burke and Wei, 2009; Fu et al., 2012; Spehar et al., 1999). This

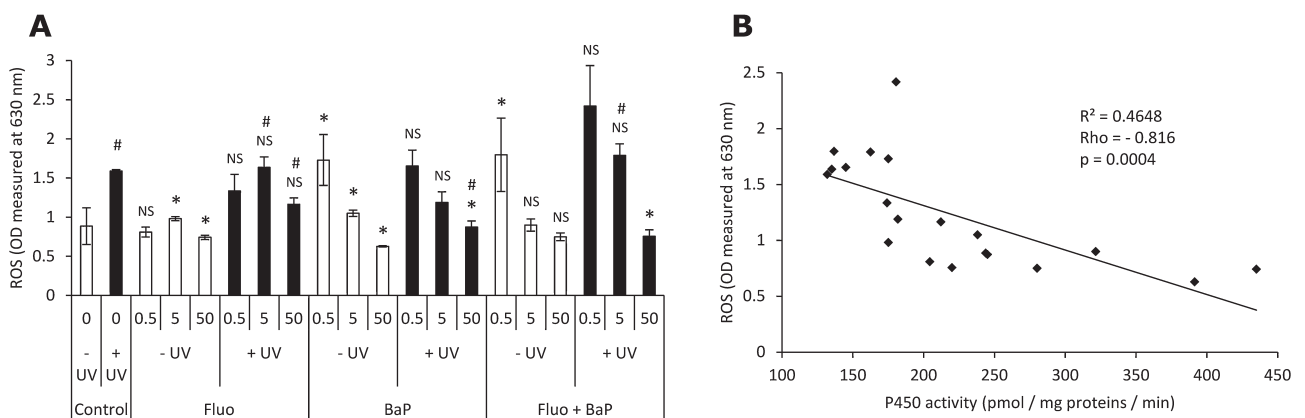


Fig. 4. Effect of UV and PAH exposure on oxidative stress: A. Quantity of ROS after exposure to fluoranthene (Fluo), benzo[a]pyrene (BaP), both (Fluo + BaP) or without PAH exposure (Control), with UV exposure (+UV, black bars) or without (–UV, white bars). For each condition of PAH exposure, significant differences relative to their corresponding control are indicated by “*” above bars, while non-significant differences are indicated by “NS”. The significant effect of UV exposure on ROS production is indicated by “#” above black bars. B. Spearman correlation between ROS quantity and P450 activities. 251658240.

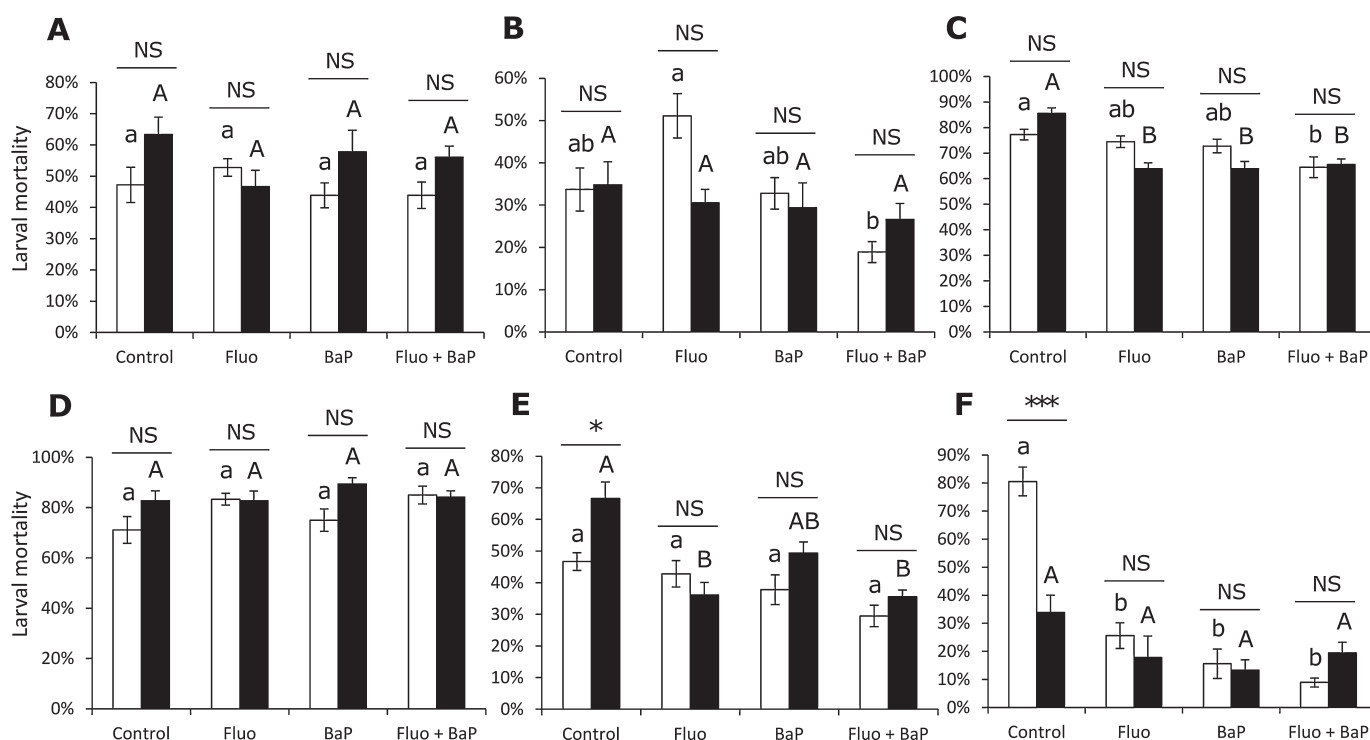


Fig. 5. Effect of UV and PAH exposure on insecticide susceptibility of mosquitoes: Insecticide susceptibility of mosquito larvae exposed to 50 µg L⁻¹ of fluoranthene (Fluo), benzo[a]pyrene (BaP), a mixture of fluoranthene and BaP (Fluo + BaP), or not exposed to PAH (Control), in presence of UV (+UV, black bars) or not (-UV, white bars). Bioassay was conducted with *Bti* (A), DDT (B), imidacloprid (C), permethrin (D), propoxur (E) and temephos (F). Significant differences between PAH exposure are indicated by different lower case letters (non UV-exposed larvae) or by different capital letters (UV-exposed larvae) above the bars. For each condition of PAH exposure, significant effect of UV-exposure is indicated by "****" ($p < 0.001$) or "***" ($p < 0.05$) while "NS" indicates a non-significant difference ($p > 0.05$).

latter hypothesis is supported by our results showing an elevated ROS production in larvae exposed to fluoranthene and UV.

By contrast, cell and tissue mortality was observed in larvae exposed to BaP, even without UV exposure. To become toxic and generate reactive metabolites, biotransformation of BaP by cytochrome P450 is required (Wessel et al., 2012). Altogether, our results tend to confirm that BaP is quickly metabolized by the detoxification system, and that the metabolites produced induce cell death, even in the absence of UV. Additional experiments following the fate of the BaP and its metabolites in the MTs over time may be necessary to validate this hypothesis and correlate the cell death with the amount of BaP and metabolites in the MTs.

The addition of UV only induces a slight increase of cell mortality for the highest concentration of BaP, which could be explained by an increase of ROS production after UV exposure. However, this increase is probably not due to a direct effect of UV on BaP considering that, as opposed to fluoranthene, no study reported an effect of UV on the reactivity of BaP. Interestingly, when fluoranthene and BaP were mixed together, no cell mortality was observed even at the highest concentration and upon UV exposure. In mammals, fluoranthene is known to inhibit the metabolism of BaP and production of reactive metabolites by directly interacting with both cytochrome P450 and the aryl hydrocarbon receptor (Wessel et al., 2012). However, BaP considerably increases the capacity of detoxification enzymes to metabolize fluoranthene (Hudson et al., 2010), therefore potentially decreasing its capacity to react with UV, as observed in our study. These two phenomena may explain the lack of cell mortality in MTs, when mosquitoes were exposed to BaP and fluoranthene. In contrast to the rational principle that exposure to multiple xenobiotics is more detrimental to the organism than a single pollutant exposure, our results suggest that, in the case of PAHs presented in this study, an exposure to two different molecules induce less deleterious effects than any of the

two separately. Such unknown interactions and processes have to be further investigated. These results confirm the intricate and challenging issue of evaluating the biological effects of xenobiotics within complex mixtures (Devier et al., 2011).

Next, we investigated the effect of PAHs and UV exposure on the activity of detoxification enzymes, which are involved in xenobiotic detoxification and response to oxidative stress. Esterase activities were induced by either PAHs or UV irradiation. This induction was further enhanced upon combined co-exposure to PAHs and UV. The capacity of UV to induce esterase activities has been observed previously in mosquitoes (Tetreau et al., 2013), but the precise mechanisms involved are still unknown and require further work.

Impact of UV and PAHs on cytochrome P450 activities did not reveal a clear pattern of induction. The most important finding was a negative correlation between P450 activity and the amount of ROS. This phenomenon has been widely described in aquatic animals, and seems to be due to a direct effect of ROS leading to a decreased activity of P450 enzymes both *in vivo* and *in vitro* (Marionnet et al., 2006; Reynaud et al., 2008).

GST activities were globally increased upon UV exposure, while these were not affected by the exposure to PAHs. Most of GSTs exhibit a peroxidase activity that could help handling ROS produced by an oxidative agent, such as UV (Yang et al., 2010), explaining why GST activity is increased upon UV exposure. Regarding the effect of BaP and fluoranthene exposure on GSTs, our results are consistent with previous articles reporting that exposure of insects and fish to PAHs did not increase GST activities (Jebali et al., 2013; Poupardin et al., 2008; Thompson et al., 2010).

Finally, we observed in this study different patterns of susceptibility to insecticides after PAH and UV exposures. A simultaneous exposure of PAHs and UV decreased mosquito susceptibility toward two insecticides out of the six tested—namely propoxur and imidacloprid, which belong to the carbamate and neonicotinoid

families, respectively. In both cases, the pollutant effect was negligible at the concentrations chosen, but UV alone induced a higher larval susceptibility to propoxur. It is still unclear as to why the mixture of pollutants and UV could affect the tolerance to these two insecticides, while exposure to each parameter separately did not significantly modify larval tolerance (except UV on propoxur susceptibility). Thus, these results emphasize the need for a careful evaluation of biological effects of xenobiotics within complex mixtures under different physicochemical conditions (Devier et al., 2011).

Exposure to pollutants or UV led to increased larval tolerance to temephos. A previous study reported that exposure of mosquito larvae to fluoranthene led to an enhanced mosquito tolerance to temephos (Poupardin et al., 2008) but the present article provides the first report of an increased tolerance to temephos through BaP, a mixture of fluoranthene and BaP or UV exposure. Nonetheless, exposing larvae to both PAHs and UV did not reveal a cumulative effect on the mosquito susceptibility toward insecticides. Several hypotheses can explain this phenomenon: (1) PAHs and UV may involve distinct biological mechanisms that do not act synergistically; (2) The action of PAHs or UV alone may have triggered detoxification processes to maximal levels leading to a maximal inducible tolerance to temephos, therefore addition of supplementary pro-active parameters would fail in increasing the observed tolerance; (3) Considering the strong effect of UV on the tolerance to temephos (from 80 to 34% larval mortality), the resolution of the diagnostic bioassay may not be sufficient to reveal a significant effect of the pollutant on tolerance (from 30 to 13% larval mortality). In addition, the increase in esterase activities may also explain the increased tolerance to temephos, as it has already been shown that the main metabolic pathway of temephos detoxification involves esterases (Marcombe et al., 2012; Melo-Santos et al., 2010; Strode et al., 2012).

Surprisingly, tolerance to insecticides closest to the PAH chemical structure, i.e. DDT and permethrin (aromatic molecules), were not affected by pre-exposure to PAHs and UV. These results are somewhat surprising considering that previous studies reported a significant increased tolerance to permethrin after 24-h exposure to 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ of fluoranthene (Poupardin et al., 2008) and 72 h exposure to 25 and 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ of BaP (Riaz et al., 2009). In the present article, we used a 5-fold lower concentration of fluoranthene, and the exposure time to BaP was 3-fold shorter, which could explain the lack of induction. Moreover, detoxification of permethrin and DDT is usually mediated by P450s, which, in our study, were not strongly affected by PAHs or UV (Chiu et al., 2008; David et al., 2013; Riveron et al., 2013). Therefore, the absence of increased tolerance for these two insecticides is consistent with the absence of increased P450 activity.

Lastly, although a recent study reported contrasting patterns between tolerance to chemical and biological insecticides after exposure to UV at low concentrations during the entire larval development of mosquito (Tetreau et al., 2013), the present results show that a short UV exposure of 1 h prior to bioassay did not have the same impacts on the mosquito physiology. This suggests that the metabolic responses of mosquito larvae to UV stress are different, depending on if they are submitted to chronic or short exposures. Therefore, exposing mosquito to PAHs and to UV simultaneously during their entire larval development will provide different but complementary data, and help understanding what may happen in open breeding sites regularly polluted by urban xenobiotics.

5. Conclusions

UV light and pollutants are both factors that can affect mosquito populations separately but the combined effect of UV and pollutants had never been taken into account. Although belonging to

the same family of compounds, the two PAHs triggered different response mechanisms upon UV irradiation. Fluoranthene and UV increased ROS, thus increasing cell mortality, and decreased P450 metabolism. Conversely, BaP, which is metabolized by P450s into toxic compounds, induced cell mortality, probably through its toxic metabolites. UV and pollution are thus abiotic parameters that can affect the physiology and the tolerance of mosquitoes to insecticides but their effect, individually and in combination, is complex and hard to foresee. Therefore, further investigations are required to decipher to which extent these parameters may influence the efficacy of insecticide-based vector control strategies in the field.

Acknowledgments

The authors want to thank Thierry Gaude for technical assistance. They also want to thank Patrick Meresse from the "Centre Universitaire de Biologie Expérimentale" (CUBE) for providing an unrestricted access to the microscopy platform. Guillaume Tetreau was supported by the University of Grenoble and Alexia Chandor-Proust and Idir Akhouayri by the 'AvecNet' FP7 European project. Frédéric Faucon and Sophie Prud'homme were supported by the French Ministry of Research and Renaud Stalinski by the French Rhône-Alpes region.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.10.031>.

References

- Arfsten, D.P., Schaeffer, D.J., Mulveny, D.C., 1996. The effects of near ultraviolet radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 33, 1–24.
- Burke, K.E., Wei, H., 2009. Synergistic damage by UVA radiation and pollutants. *Toxicology and Industrial Health* 25, 219–224.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H., 2007. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270–280.
- Chiu, T.-L., Wen, Z., Rupasinghe, S.G., Schuler, M.A., 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8855–8860.
- Dahms, H.-U., Lee, J.-S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology* 97, 3–14.
- David, J.-P., Ismail, H.M., Chandor-Proust, A., Paine, M.J.I., 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 368.
- Davies, S.-A., Overend, G., Sebastian, S., Cundall, M., Cabrero, P., Dow, J.A.T., Terhzaz, S., 2012. Immune and stress response 'cross-talk' in the *Drosophila* Malpighian tubule. *Journal of Insect Physiology* 58, 488–497.
- Denissenko, M.F., Pao, A., Tang, M.S., Pfeifer, G.P., 1996. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 274, 430–432.
- Devier, M.-H., Mazellier, P., Ait-Aissa, S., Budzinski, H., 2011. New challenges in environmental analytical chemistry: identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chimie* 14, 766–779.
- Dick, O.B., San Martin, J.L., Montoya, R.H., del Diego, J., Zambrano, B., Dayan, G.H., 2012. The history of dengue outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 87, 584–593.
- Dortch, M.S., Zakikhani, M., Kim, S.C., Steevens, J.A., 2008. Modeling water and sediment contamination of Lake Pontchartrain following pump-out of Hurricane Katrina floodwater. *Journal of Environmental Management* 87, 429–442.
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynski, J., 1997. Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* 34, 857–867.
- Fu, P.P., Xia, Q., Sun, X., Yu, H., 2012. Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Journal of Environmental Science and Health Part C-Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* 30, 1–41.

- Gubler, D.J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 480–496.
- Haritash, A.K., Kaushik, C.P., 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials* 169, 1–15.
- Huderson, A.C., Harris, D.L., Niaz, M.S., Ramesh, A., 2010. Effect of benzo(a)pyrene exposure on fluoranthene metabolism by mouse adipose tissue microsomes. *Toxicology Mechanisms and Methods* 20, 53–58.
- Jebali, J., Chicano-Galvez, E., Banni, M., Guerbej, H., Boussetta, H., Lopez-Barea, J., Alhama, J., 2013. Biochemical responses in seabream (*Sparus aurata*) caged in-field or exposed to benzo(a)pyrene and paraquat: characterization of glutathione S-transferases. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88, 169–177.
- Jurado, A., Vazquez-Sune, E., Carrera, J., Lopez de Alda, M., Pujades, E., Barcelo, D., 2012. Emerging organic contaminants in groundwater in Spain: a review of sources, recent occurrence and fate in a European context. *Science of the Total Environment* 440, 82–94.
- Lampi, M.A., Gurska, J., McDonald, K.I.C., Xie, F., Huang, X.-D., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., 2006. Photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*: ultraviolet-mediated effects and the toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon photoproducts. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1079–1087.
- Lee, B.M., Shim, G.A., 2007. Dietary exposure estimation of benzo(a)pyrene and cancer risk assessment. *Journal of Toxicology and Environmental Health—Part A—Current Issues* 70, 1391–1394.
- Machala, M., Vondracek, J., Blaha, L., Ciganek, M., Neca, J., 2001. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons determined using *in vitro* reporter gene assay. *Mutation Research—Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 497, 49–62.
- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., Riaz, M.-A., Poupardin, R., Selior, S., Darriet, F., Reynaud, S., Yebakima, A., Corbel, V., David, J.-P., Chandre, F., 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS One* 7.
- Marionnet, D., Deschaux, P., Reynaud, S., 2006. Possible implication of macrophages in the regulation of cytochrome P450 activities in carp (*Cyprinus carpio*). *Fish & Shellfish Immunology* 21, 80–91.
- Melo-Santos, M.A.V., Varjal-Melo, J.J.M., Araujo, A.P., Gomes, T.C.S., Paiva, M.H.S., Regis, L.N., Furtado, A.F., Magalhaes, T., Macoris, M.L.G., Andrighetti, M.T.M., Ayres, C.F.J., 2010. Resistance to the organophosphate temephos: mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica* 113, 180–189.
- Mohan, M., Taneja, T.K., Sahdev, S., Mohareer, K., Begum, R., Athar, M., Sah, N.K., Hasnain, S.E., 2003. Antioxidants prevent UV-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial cytochrome c release and caspase activation in *Spodoptera frugiperda* (SF9) cells. *Cell Biology International* 27, 483–490.
- Pitt, R., Lalor, M., Field, R., Brown, M., 1993. The investigation of source area controls for the treatment of urban stormwater toxicants. *Water Science and Technology* 28, 271–282.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 540–551.
- Poupardin, R., Riaz, M.A., Jones, C.M., Chandor-Proust, A., Reynaud, S., David, J.P., 2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquatic Toxicology* 114–115, 49–57.
- R Development Core Team, 2007. R: A Language and Environment for Statistical Computing. (<http://www.R-project.org>).
- Reynaud, S., Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology* 77, 229–238.
- Reynaud, S., Duchiron, C., Deschaux, P., 2001. 3-methylcholanthrene increases phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity and intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.) macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology* 175, 1–9.
- Reynaud, S., Marionnet, D., Taysse, L., Duchiron, C., Deschaux, P., 2002. The effects of 3-methylcholanthrene on macrophage respiratory burst and biotransformation activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 12, 17–34.
- Reynaud, S., Raveton, M., Ravanel, P., 2008. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review. *Aquatic Toxicology* 87, 139–145.
- Riaz, M.A., Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., David, J.P., 2009. Impact of glyphosate and benzo(a)pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquatic Toxicology* 93, 61–69.
- Riveron, J.M., Irving, H., Ndula, M., Barnes, K.G., Ibrahim, S.S., Paine, M.J., Wondji, C.S., 2013. Directionally selected P450 alleles are driving the spread of pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles funestus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 252–257.
- Ross, R., 1901. Malaria and mosquitoes. *Nature* 63, 440–440.
- Sang, W., Ma, W.-H., Qiu, L., Zhu, Z.-H., Lei, C.-L., 2012. The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-a exposure in the beetle *Tribolium castaneum*. *Journal of Insect Physiology* 58, 830–836.
- Scott, M.P., 2007. Developmental genomics of the most dangerous animal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 11865–11866.
- Spehar, R.L., Poucher, S., Brooke, L.T., Hansen, D.J., Champlin, D., Cox, D.A., 1999. Comparative toxicity of fluoranthene to freshwater and saltwater species under fluorescent and ultraviolet light. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 496–502.
- Strode, C., de Melo-Santos, M., Magalhaes, T., Araujo, A., Ayres, C., 2012. Expression profile of genes during resistance reversal in a temephos selected strain of the dengue vector, *Aedes aegypti*. *PLoS One* 7.
- Tetreau, G., Chandor-Proust, A., Faucon, F., Stalinski, R., Akhouayri, I., Prud'homme, S.M., Raveton, M., Reynaud, S., 2013. Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. *Aquatic Toxicology* 140–141, 389–397.
- Thompson, E.D., Burwinkel, K.E., Chava, A.K., Notch, E.G., Mayer, G.D., 2010. Activity of phase I and phase II enzymes of the benzo a pyrene transformation pathway in zebrafish (*Danio rerio*) following waterborne exposure to arsenite. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152, 371–378.
- Tomori, O., 2004. Yellow fever: the recurring plague. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 41, 391–427.
- Wessel, N., Menard, D., Pichavant-Rafini, K., Ollivier, H., Le Goff, J., Burgeot, T., Akcha, F., 2012. Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*). *Aquatic Toxicology* 108, 33–41.
- WHO, 1998. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Drinking-Water—Background document for Development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. World Health Organization, Geneva, NY.
- WHO, 2005. Guidelines For Laboratory and Field Testing of Mosquito Larvicides. World Health Organization, Geneva, NY.
- Xue, W.L., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, 73–93.
- Yang, L.-H., Huang, H., Wang, J.-J., 2010. Antioxidant responses of citrus red mite, *Panonychus citri* (McGregor) (Acari Tetranychidae), exposed to thermal stress. *Journal of Insect Physiology* 56, 1871–1876.
- Zhang, L., Wang, M.-H., Hu, J., Ho, Y.-S., 2010. A review of published wetland research, 1991–2008: ecological engineering and ecosystem restoration. *Ecological Engineering* 36, 973–980.

Annexe II :

Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A.



Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A



Guillaume Tetreau^{*,1}, Alexia Chandor-Proust¹, Frédéric Faucon¹, Renaud Stalinski¹, Idir Akhouayri¹, Sophie M. Prud'homme¹, Muriel Raveton, Stéphane Reynaud

Laboratoire d'Ecologie Alpine, LECA-UMR 5553, Université de Grenoble 1, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2013

Received in revised form 27 June 2013

Accepted 8 July 2013

Keywords:

Ultraviolet

Aedes aegypti

Bioassays

Enzymatic activities

Candidate gene expression

RT-qPCR

ABSTRACT

Mosquitoes are vectors of major human diseases, such as malaria, dengue or yellow fever. Because no efficient treatments or vaccines are available for most of these diseases, control measures rely mainly on reducing mosquito populations by the use of insecticides. Numerous biotic and abiotic factors are known to modulate the efficacy of insecticides used in mosquito control. Mosquito breeding sites vary from opened to high vegetation covered areas leading to a large ultraviolet gradient exposure. This ecological feature may affect the general physiology of the insect, including the resistance status against insecticides. In the context of their contrasted breeding sites, we assessed the impact of low-energetic ultraviolet exposure on mosquito sensitivity to biological and chemical insecticides.

We show that several mosquito detoxification enzyme activities (cytochrome P450, glutathione S-transferases, esterases) were increased upon low-energy UV-A exposure. Additionally, five specific genes encoding detoxification enzymes (*CYP6BB2*, *CYP6Z7*, *CYP6Z8*, *GSTD4*, and *GSTE2*) previously shown to be involved in resistance to chemical insecticides were found over-transcribed in UV-A exposed mosquitoes, revealed by RT-qPCR experiments. More importantly, toxicological bioassays revealed that UV-exposed mosquitoes were more tolerant to four main chemical insecticide classes (DDT, imidacloprid, permethrin, temephos), whereas the bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) appeared more toxic.

The present article provides the first experimental evidence of the capacity of low-energy UV-A to increase mosquito tolerance to major chemical insecticides. This is also the first time that a metabolic resistance to chemical insecticides is linked to a higher susceptibility to a bioinsecticide. These results support the use of *Bti* as an efficient alternative to chemical insecticides when a metabolic resistance to chemicals has been developed by mosquitoes.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mosquitoes are considered as the most dangerous animals worldwide due to their capacity to transmit major human diseases, such as malaria, dengue or yellow fever (Gubler, 1998; Ross, 1901; Tomori, 2004). They represent a heavy sanitary and economic burden, especially in highly-impacted developing countries. Because of the lack of cost-effective and long-lasting drug treatments or

vaccines for most mosquito-borne diseases, control measures historically and currently target vector populations through the use of highly efficient chemical insecticides (Hemingway et al., 2006; Killeen et al., 2002). Nevertheless, chemical usage has detrimental side effects, such as high environmental persistence and low mosquito specificity by their toxicity to non-target insect species (Diabate et al., 2002). Moreover, mosquito populations show full resistance to all chemical insecticide classes used in vector control, threatening the long-term efficacy of chemical-based control interventions (Enayati and Hemingway, 2010; Hemingway and Ranson, 2000). The increasing awareness for the need of a more integrated strategy to control mosquito populations has led to the development of alternative strategies, including the use of genetically engineered mosquitoes (de Valdez et al., 2011; Scott et al., 2002) or entomopathogenic microorganisms, such as the insect reproductive parasite *Wolbachia* (Iturbe-Ormaetxe et al., 2011), toxic fungal species (Blanford et al., 2005; Scholte et al., 2005), resident mosquito microbial symbionts (Cirimotich et al., 2011) or the bioinsecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) (Goldberg

* Corresponding author. Present address: Department of Entomology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA. Tel.: +1 315 787 2476; fax: +1 315 787 2326.

E-mail addresses: guillaume.tetreau@gmail.com (G. Tetreau), alexia.chandor@gmail.com (A. Chandor-Proust), frederic.faucon4@orange.fr (F. Faucon), renaud.stalinski@gmail.com (R. Stalinski), ig.akhouayri@yahoo.com (I. Akhouayri), prudhomme.sophie@gmail.com (S.M. Prud'homme), muriel.raveton@ujf-grenoble.fr (M. Raveton), stephane.reynaud@ujf-grenoble.fr (S. Reynaud).

¹ Equal contributions.

and Margalit, 1977). Technical drawbacks and high costs combined with lower efficacy compared to chemicals have strongly delayed the widespread use of bioinsecticides as a long-term alternative to chemicals. Biological insecticides intrinsically target distinct aspects of the mosquito physiology when compared to chemical insecticides; for instance, chemicals used in current control programs are neurotropic agents blocking synaptic transmission in the insect central nervous system (Soderlund, 2008), whereas *Bti*, the major bioinsecticide used worldwide, directly disrupts the intestinal gut (Vachon et al., 2012). Therefore, *Bti* may represent a promising alternative to chemicals by sustaining its toxicity toward mosquito populations highly resistant to chemicals. Although this hypothesis has been largely accepted and relayed by the scientific community (Bravo et al., 2011; Lacey et al., 2001; Roh et al., 2007; Schnepf et al., 1998), to our knowledge it has never been experimentally validated.

Numerous biotic and abiotic factors were shown to affect the efficacy of insecticides on mosquito populations, such as temperature (Christiansen et al., 2004; Sibanda et al., 2011), water pH (Mittal et al., 1995), altered nycthemeral rhythm (Yang et al., 2010), presence of organic matter (Tetreau et al., 2012b) or water pollution (Poupardin et al., 2008; Riaz et al., 2009). A large part of the mosquito life cycle consists of four aquatic larval stages, which live in highly contrasted natural or man-made breeding sites, such as agricultural fields or highly urbanized sites. Suitable mosquito breeding sites could vary widely in term of light exposure from large opened areas with maximal exposure to shaded water pools with high vegetation coverage in forestry settings. Major disease vectors, such as the malaria vector *Anopheles gambiae*, the dengue vector tiger mosquito *Aedes albopictus*, the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* or *Culex quinquefasciatus* transmitting West Nile virus and filarial worms, show distinct preferences in their breeding sites; *An. gambiae* breeding sites are often described as clean shallow water pounds, whereas *Aedes* and *Culex* mosquitoes are more opportunistic, underlying the invasive features of the tiger mosquito for instance through European mainland (Benedict et al., 2007). With such contrasted breeding sites, mosquito larvae can be exposed to an important UV gradient, from woodland ponds and sewers, to large open areas of stagnant water or uncovered containers. To date, there is no report on the effect of UV light on the insecticide susceptibility of mosquitoes, despite a huge literature on the impact of UV on insect oxidative stress responses, general physiology and populations (Ballare et al., 2001; Ingram, 1992; Mazza et al., 2002; Wang et al., 2001). Using the yellow fever mosquito vector *Ae. aegypti* as a versatile model species for breeding site type, the present article reports an opposite effect of low-energy UV-A light on the mosquito susceptibility to five major chemical insecticide classes (namely the organochlorine DDT, the organophosphate temephos, the pyrethroid permethrin, the carbamate propoxur and the neonicotinoid imidacloprid) and to the bioinsecticide *Bti*. This contrasting pattern of tolerance was linked to an increase of all detoxification enzyme activities and a mRNA over-expression of several candidate genes previously associated with insecticide resistance. All the results are discussed with regard to mosquito control strategies and resistance management.

2. Methods

2.1. Mosquito strain and experimental design

A laboratory *Ae. aegypti* strain Bora–Bora susceptible to all insecticides has been used. After egg hatching, larvae were reared in tap water and fed with standardized amount of larval food (hay pellets) at a temperature of 27 °C with 80% of relative humidity and a 15/9 h light/dark period. Three different conditions of UV

exposure were performed; larvae were not exposed to UV (“UV 0”) or exposed 2 h (“UV 2”) or 15 h (“UV 15”) every day during 4 days (from egg hatching to 3rd instar larval stage) to UV-A ($\lambda = 365$ nm) at 70 W/m² (Vilbert-Lourmat 115.L 15 W lamp), which represents a very low UV-index of 1.14 (calculated according to the standardized ISO/CIE procedure; correction factor for 365 nm: 0.000407). In our settings, a 2 h daily exposure may represent a daily noon maximal exposure in an otherwise shaded breeding site, whereas 15 h daily exposure represents open areas with long-lasting exposure with no coverage on the mosquito breeding site.

2.2. Effect of UV on cell and tissue mortality.

To monitor the effect of UV on mosquito cell mortality, living larvae from the three conditions were incubated for 3 h in a solution of 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of propidium iodide (PI). Thereafter larvae were put in water for 1 h. A positive control of cell mortality test was performed by incubating larvae with 70% ethanol for 5 min. Larvae were then observed using a stereo zoom microscope (SZX16, Olympus) under normal light (“Visible”) and epifluorescence (excitation: 450–490 nm and emission ≥ 520 nm (“PI”) or both (“Merge”).

2.3. Enzyme activities and ROS measurement

800 fresh larvae per condition (2 h-, 15 h-exposure and control) were homogenized by a glass-teflon homogenizer on ice (10 strokes) in 0.05 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 0.5 mM DTT, 2 mM EDTA and 0.8 mM PMSF. The homogenate was then centrifuged at 10,000 $\times g$ for 20 min at 4 °C and the resulting supernatant was ultracentrifuged at 100,000 $\times g$ for 1 h at 4 °C. The pellet (microsomal fraction) was resuspended into 500 μL 0.05 M phosphate buffer and used for cytochrome P450 monooxygenases activities measurement. The supernatant (cytosolic fraction) was used for all other enzyme activity measurements. Three replicates were performed for each condition.

P450 activities were measured by using 7-ethoxyresorufin (EROD, Sigma) as substrate as described in Reynaud et al. (2002) with modifications for micro-plate measurements. The activity was assayed at 30 °C in a medium containing 20 μg microsomal proteins, Glucose-6-Phosphate (G6P) (5 mM), NADPH (0.1 mM), G6P dehydrogenase (1 U mL⁻¹), 7-ethoxyresorufin (5 μM), and phosphate buffer (50 mM Na₂PO₄; pH 7.4) in a final volume of 200 μL . Fluorescence (excitation 537 nm; emission 583 nm) was recorded every 30 s during 40 min in a Varioskan Flash Multimode Reader (multiplate reader; Thermo Scientific). Glutathione-S-transferase (GST) activities were measured by using 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, Sigma) as substrate as described in Riaz et al. (2009) with slight modifications. The reaction mixture contained 20 μg protein from the cytosolic fraction, 1.3 mM reduced glutathione (Sigma) and 1 mM CDNB in 0.1 M phosphate buffer; pH 6.9. The absorbance of the reaction solution at 340 nm was measured after 1 min. Esterase activities were measured by using α -naphthyl acetate and β -naphthyl acetate as substrates (Sigma) (Van Asperen, 1962) as described in (Poupardin et al., 2008). Catalases activities were measured spectrophotometrically at 240 nm during 60 s, using 200 μL proteins from the cytosolic fraction in 1.6 mL buffer and 10 mM H₂O₂, as described in (Dubovskii et al., 2010). The activity of catalase (H₂O₂ decomposition) was expressed in $\mu\text{mol min}^{-1}$ using the extinction coefficient of 0.0394 mM⁻¹ cm⁻¹ for hydrogen peroxide.

The amount of reactive oxygen species (ROS) was measured by reduction of the redox dye nitroblue tetrazolium (NBT) (Sigma, France) as described in Reynaud et al. (2001) with modifications. Twenty larvae were added to 1 mL of a 1 mg L⁻¹ NBT solution for 2 h in the dark at room temperature. Larvae were washed twice in ethanol, air dried and the formazan produced was then dissolved

in 50 μL KOH (2 M) and 75 μL DMSO. The turquoise-blue colored solution was read at 630 nm.

The effect of UV-exposure on each enzyme activity was tested by a Wilcoxon test ($N=3$) performed on R 2.15.2 software (R Development Core Team, 2007).

2.4. mRNA expression of candidate genes by real-time quantitative PCR (RT-qPCR)

mRNA was extracted from 50 larvae from each condition in triplicate using RNAqueous[®]-4PCR kit (Ambion), treated with DNase I (Ambion) following manufacturer's instructions, and reverse transcribed using a SuperScript III (Invitrogen) reverse transcriptase and oligo-dT20 primers (Invitrogen) as described in (Tetreau et al., 2012a). RT-qPCR was performed on an iQ5 system (Bio-Rad) using an iQ SYBR Green supermix (BioRad) following manufacturer's instructions. Twelve candidate genes, already implicated in resistance to chemical insecticides or in oxidative stress, were tested. Specific primers were designed for each gene using Beacon Designer v.5.10 software (Premier Biosoft International). The primer pair for HSP90 was designed in the highly conserved region between all the HSP90 genes described in the *Ae. aegypti* genome (AAEL011704, AAEL011708, AAEL014843 and AAEL014845). Specificity of each primer pair was first assessed by BLAST analysis against *Ae. aegypti* genome and then verified by performing a melt curve analysis. All the information relative to the primer used and the efficiency of the qPCR experiment are indicated in the Table 1, according to the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). Genes encoding ribosomal proteins RPL8 and RPS7 (housekeeping genes) were used for normalization of mRNA expression of the studied genes taking into account PCR efficiency using $\Delta\Delta\text{CT}$ method, calculated using the iQ5 software (Bio-Rad) (Pfaffl, 2001). Only genes showing more than 1.5-fold over-transcription were considered induced.

2.5. Bioassay

Bioassay experiment was performed under normal light on 4-days old larvae (third instar). Diagnostic concentrations were chosen in order to obtain about 50% of larval mortality in the control ("UV 0"). 78 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, 2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$, 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 6 $\mu\text{g L}^{-1}$ were used for *Bti*, DDT, imidacloprid, permethrin, propoxur and temephos, respectively. Larval mortality was monitored after 24 h of exposure to the insecticide. Ten replicates were performed for each insecticide and each condition. The effect of UV-exposure on larval mortality was tested by a one-way analysis of variance (ANOVA) performed on R 2.15.2 software (R Development Core Team, 2007).

3. Results

3.1. Impact of UV-exposure on cell and tissue mortality

The exposure of *Ae. aegypti* larvae to low-energy UV-A for 2 or 15 h daily [from egg hatching to 3rd instar stage (4days)] did not trigger any noticeable cell mortality, regardless of the duration of the exposure (Fig. 1).

3.2. Larval enzyme activities are enhanced upon UV exposure

We studied the impact of UV exposure on well-known detoxification enzymes involved in insecticide metabolism, such as cytochrome P450, the glutathione-S-transferase (GST) and esterase activities. A significant increase (1.6–2.3-fold) of all detoxification enzyme activities was observed when larvae were exposed to UV, even after a daily 2 h UV-exposure ($p=2.7 \times 10^{-2}$, 4.4×10^{-2} , 8.5×10^{-3} and 7.3×10^{-3} for alpha-esterases, beta-esterases, GST

and cytochrome P450 activities, respectively (Fig. 2A–D). Oxidative stress response activities were also investigated; catalase activities were significantly increased (2.1-fold) in daily 15 h UV-exposed larvae ($p=4.95 \times 10^{-2}$), but not after 2 h exposure ($p=0.20$) (Fig. 2E). No change in the reactive oxygen species (ROS) production was observed regardless of the exposure condition ($p=0.67$) (Fig. 2F).

3.3. UV exposure up-regulates mRNA expression of genes putatively involved in insecticide resistance

Enhanced detoxification activities through UV exposure prompted us to examine the transcription of genes previously found up-regulated in mosquito strains resistant to chemicals as well as several other genes involved in cellular stress response. The transcription of a subset of 12 genes was assessed by RT-qPCR in 2 and 15 h UV-exposed larvae compared to non-exposed samples. Fifteen hours of daily UV-exposure induced 1.9, 1.9 and 1.6-fold over-expression of the cytochrome P450 encoding genes CYP6BB2 (AAEL014893), CYP6Z7 (AAEL009130) and CYP6Z8 (AAEL009131), respectively, and a 1.9 and 1.6-fold over-expression of the glutathione-S-transferase encoding genes, GSTD4 (AAEL001054) and GSTE2 (AAEL007951) respectively, relative to non-exposed controls (Fig. 3). UV-exposure did not alter the expression of CYP6N9 (AAEL009121), of genes encoding two esterases Est.15578 (AAEL015578) and CCEae3o (AAEL011944) and of the stress responsive genes encoding heat shock proteins HSP70 (AAEL004148, AAEL006531, AAEL010948) and HSP90 (AAEL011704, AAEL011708, AAEL014843, AAEL014845).

3.4. UV-induced contrasting patterns of tolerance to chemical vs biological insecticides

The susceptibility to six different insecticides was assessed between UV-A exposed larvae and non-exposed ones. Whereas larval susceptibility to the carbamate propoxur was not affected by UV exposure at any time period, a significant positive effect on larval tolerance to DDT ($p=6.6 \times 10^{-3}$) and permethrin ($p=2.0 \times 10^{-2}$) was observed in 2 h daily UV-exposed larvae (Fig. 4). The tolerance phenotype was further emphasized in 15 h daily-exposed larvae with 18%, 22%, 23.5% and 28.5% tolerance increase to imidacloprid ($p=5.0 \times 10^{-3}$), DDT ($p=2.5 \times 10^{-4}$), temephos ($p=6.0 \times 10^{-3}$) and permethrin ($p=5.0 \times 10^{-5}$) respectively. By contrast, a significant 13.5% increased susceptibility to *Bti* in 15 h UV-exposed larvae was noticed ($p=4.8 \times 10^{-2}$).

4. Discussion

In the present article, we describe strong detoxification responses associated with increased tolerance to chemical insecticides in mosquito larvae exposed to low energy UV-A light. These results were very surprising taking into account the available literature demonstrating the strong negative synergistic effect of UV and pesticides on organisms, higher than the simple summation of the independent effects of these stressors (Beketov et al., 2011). The admitted explanation for this synergistic effect is that UV radiation could increase the organisms' sensitivity to pesticides (Beketov et al., 2011; Liess et al., 2001). Generally, nonchemical stressors reducing individual fitness and causing mortality also do increase sensitivity to toxicants (Heugens et al., 2001). In our study, the biological responses observed may be global non-specific physiological responses to UV stress, amongst which insecticide metabolic processes may be involved. The factor, which may explain the difference between our study and previous literature, is the fact that UV stress was applied prior the insecticide exposure limiting the synergistic effect and allowing the induction of metabolic detoxification processes before insecticide penetration. Indeed, the main

Table 1
Primer pairs used for RT-qPCR analyses. For each primer pair, sequence, corresponding gene name and accession number, product length, Tm and optimal annealing temperature used in PCR program are indicated. PCR efficiency and different parameters of the calibration curves (R^2 , slope and y-intercept) are also indicated according to the MIQE guidelines (Bustin et al., 2009). A high specificity is indicated as “YES” when the primer pair matched to a unique position in the *Aedes aegypti* genome and when PCR product Tm was correct.

Gene name	Description	Vectorbase access number	Sequence forward primer (5′–3′)	Sequence reverse primer (5′–3′)	Annealing temperature (°C)	Calibration curves				Specificity (meltcurve& BLAST)
						PCR Efficiency	R^2	Slope	y-intercept	
CYP6BB2	Cytochrome P450	AAEL014893	GTTGTCAGTGAAACCTACGGAAG	CGGAGGTACGGCGAGTTGG	59.0	106.50%	0.987	−3.175	16.466	Yes
CYP6N9	Cytochrome P450	AAEL009121	GCAGGATAAGGCACGGAAG	CTGGAACGGTGTAGTCTTGG	58.0	96.30%	0.990	−3.415	14.225	Yes
CYP6Z7	Cytochrome P450	AAEL009130	CGATTGTTCAGTCACGATTC	TGTAGAGTCTTGCGGGAAG	53.0	88.30%	0.989	−3.640	17.235	Yes
CYP6Z8	Cytochrome P450	AAEL009131	ACCAATTACGCCATTCTG	AGGTTGTGATCCCATTCG	53.0	93.40%	0.990	−3.492	15.758	Yes
Est.15578	Alpha esterase	AAEL015578	TGCGTGTCTGTTCATATCATC	TTGCCACTTCCGTTCCATCC	58.0	99.80%	0.997	−3.326	15.001	Yes
CCEae3o	Carboxy/choline alpha esterase	AAEL011944	CGAGTTGTGGGCGAAGTATC	TCCGAACGACATTATGGCTTTG	59.0	104.00%	0.961	−3.229	25.751	Yes
GSTD4	Glutathion-S-transferase	AAEL001054	ATGGGCACGGAGGAAAATCG	AAAGTAGCACAAATCCAGCAAGC	59.0	105.40%	0.984	−3.200	11.603	Yes
GSTE2	Glutathion-S-transferase	AAEL007951	GCGGATTTTCAGTTGCGTTTCG	ACCTGCTCGGCTCCACTTC	59.0	103.00%	0.998	−3.251	11.230	Yes
HSP_4148	Heatshockprotein (HSP70)	AAEL004148	CGGAAGAGGAGAAGGAGAAGG	GCAAGCCGCTCGATTACTG	55.0	90.00%	0.998	−3.587	14.030	Yes
HSP_6531	Heatshockprotein (HSP70)	AAEL006531	ACTCTTCAGGCGTGTGG	CTGTCAATTGGATCGGAATTGG	53.0	102.60%	0.993	−3.261	10.101	Yes
HSP_10948	Heatshockprotein (HSP70)	AAEL010948	GGCACAGACGACGAACAAGG	CTTCAGCACCCGAGATTAC	55.0	94.90%	0.997	−3.452	15.404	Yes
HSP90	Heatshockproteins (HSP90)	AAEL011704 AAEL011708 AAEL014843 AAEL014845	CGGTATCGGAATGACCAAGG	CCAGATAGGACGAGTAGAAACC	53.0	99.10%	0.999	−3.345	15.115	Yes
RPL8	Ribosomal protein	AAEL000987	CTGAAGGGAACCGTCAAGCAA	TCGGCGGCAATGAACAACT	55.5	101.40%	0.997	−3.288	8.561	Yes
RPS7	Ribosomal protein	AAEL009496	GTTGGAGATGAACCTCGGACCTG	GCCTTCTGTGCTTGAACCTCG	55.5	99.80%	0.986	−3.327	13.998	Yes

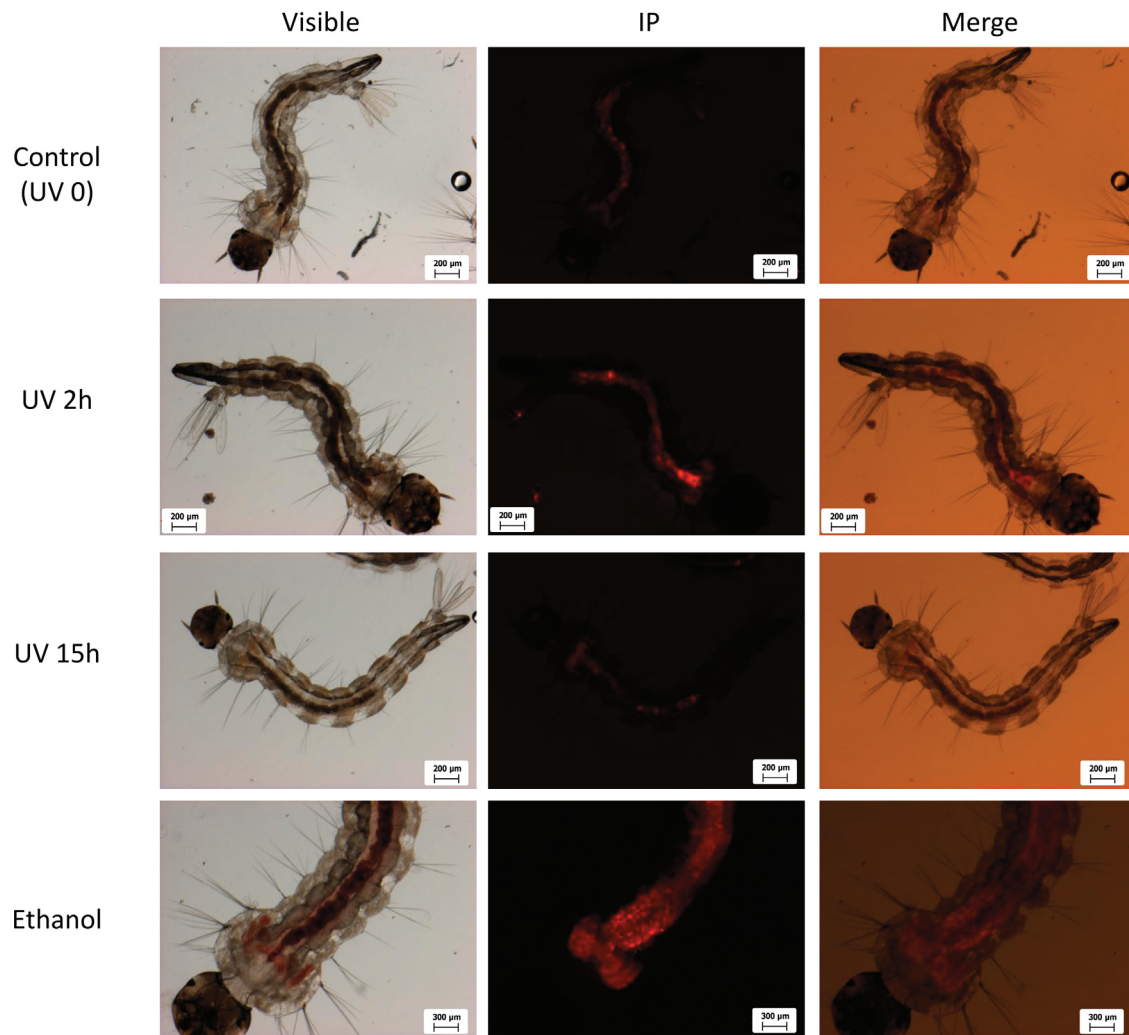


Fig. 1. Effect of UV on cell and tissue mortality. The effect of UV on mosquito cell mortality in living larvae from the three conditions (not exposed ("UV 0") or exposed 2 h ("UV 2 h") or 15 h ("UV 15 h") to UV). A positive control of gut cell mortality was performed by incubating larvae with 70% ethanol for 5 min. Larvae observed using a stereo zoom microscope (SZX16, Olympus) under normal light ("Visible"), epifluorescence (excitation: 450–490 nm and emission ≥ 520 nm ("IP") or both ("Merge") are shown. Intense red spots indicate staining of nuclei in dead cells by IP.

effect of UV on living cells is the generation of strong oxidative stress, ultimately leading to cell apoptosis in exposed organisms (Dahms and Lee, 2010; Mohan et al., 2003). More specifically, UV light is also known to induce the production of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anion and hydrogen peroxide; these ROS are chemically reactive molecules able to interfere with DNA, lipids or proteins (Dahms and Lee, 2010; Mohan et al., 2003). Superoxide anion is rapidly converted by superoxide dismutase into hydrogen peroxide, itself transformed into water by catalase or glutathione-peroxidase activities (Fukai and Ushio-Fukai, 2011). High dose and/or inadequate removal of ROS, especially superoxide anion, results in oxidative stress involved in many cellular toxic processes, including cell death (Dahms and Lee, 2010; Fukai and Ushio-Fukai, 2011; Mohan et al., 2003). Nevertheless, we did not detect cellular mortality in any larval tissues examined, regardless of the duration of UV exposure. Furthermore, consistent with the low impact of UV-A exposure, ROS production in UV-exposed larvae was not induced, while catalases, which mediate the catabolization of hydrogen peroxide, were significantly more active in 15 h daily exposure of UV light.

In addition to a lack of increased ROS production, heat shock proteins (HSP) were not induced by UV-exposure. HSP are key proteins

involved in the maintenance of protein folding when organisms are exposed to heat or other stresses, such as UV (Roberts et al., 2010; Sang et al., 2012; Zhao and Jones, 2012). Numerous studies showed that HSP can be induced by UV exposure (Kim et al., 2011; Yamashita et al., 2012), even in insects exposed to low-energetic UV-A (Sang et al., 2012). However, we did not detect transcriptional up-regulation of HSP genes in exposed samples. Altogether, our results demonstrate that UV-A used for larval irradiation had a very low impact on mosquitoes, inducing a null/low oxidative stress promptly scavenged by oxidative stress enzymes preventing cell toxicity and potential mortality.

Nevertheless, UV exposure of mosquito larvae induced an increase in cytochrome P450, glutathione-S-transferase and esterase activities, which might be linked to the increased larval tolerance to all the chemical insecticides tested, except propoxur. The unaffected larval susceptibility to the carbamate propoxur is consistent with the apparent lack of cross-metabolic resistance reported so far between propoxur and other insecticides (Chouaibou et al., 2008; Hidayati et al., 2011; Kamgang et al., 2011; Perera et al., 2008). Indeed, insect resistance to carbamates is mainly due to an alteration of the target site or of specific enzymes, such as malathion carboxylesterase (Bisset et al., 2006;

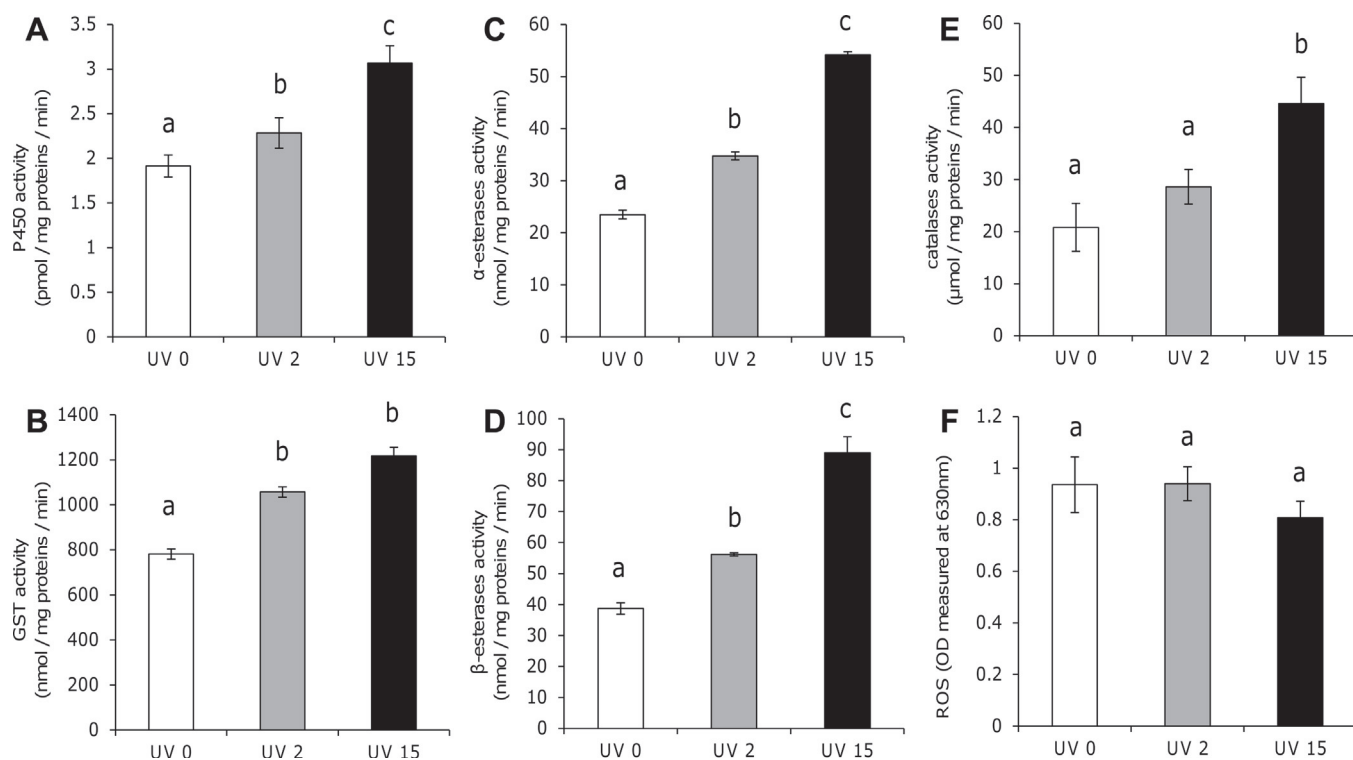


Fig. 2. Effect of UV on enzyme activities. Enzyme activities of non UV-exposed larvae ("UV 0") or exposed 2 h to UV light ("UV 2") or 15 h to UV light ("UV 15") every day. Cytochrome P450 monooxygenase activities (A), Glutathione-S-transferase (B), α -esterase (C), β -esterase (D) and catalase (E) activities are indicated. The quantity of reactive oxygen species (ROS) (F) is also shown. Values are indicated as mean percentage \pm standard error. For each enzyme activity measured, significant differences ($p < 0.05$, Wilcoxon test) between treatments are indicated by different letters above the bars.

Perera et al., 2008). Regarding UV-induced tolerance to the other insecticides, our results are consistent with the extensive literature correlating increased detoxification enzyme activities with resistance to DDT (Lumjuan et al., 2005), imidacloprid (Riaz et al., 2013), temephos (Marcombe et al., 2012; Melo-Santos et al., 2010) and pyrethroids (Marcombe et al., 2012, 2009) in field-collected populations and laboratory strains of *Ae. aegypti*. Indeed, cytochrome P450 are key enzymes involved in the first step of insecticide degradation through their oxidative activities, metabolizing insecticides into more polar molecules subsequently processed by phase 2 enzymes (Chiu et al., 2008; Muller et al., 2008; Poupardin et al., 2010; Stevenson et al., 2011). GSTs usually participate in the dechlorination or in the conjugation of reduced glutathione to the

insecticide molecules (Enayati et al., 2005; Ranson and Hemingway, 2005), and can also limit oxidative damage caused by insecticides through their peroxidase activity (Vontas et al., 2002). Both esterases and GSTs can also contribute to insecticide sequestration to reduce toxicity to mosquito larvae (Hemingway, 2000; Kostaropoulos et al., 2001). To our knowledge, this is the first evidence that induction of detoxification enzymes associated with increased tolerance to chemical insecticides can be observed following mosquito larvae exposure to low-energy ultraviolet.

Numerous studies demonstrated the ability of members of the P450 subfamily CYP6 to metabolize various chemical insecticides responsible for metabolic resistance in mosquitoes (Chiu et al., 2008; David et al., 2013; Mitchell et al., 2012; Muller

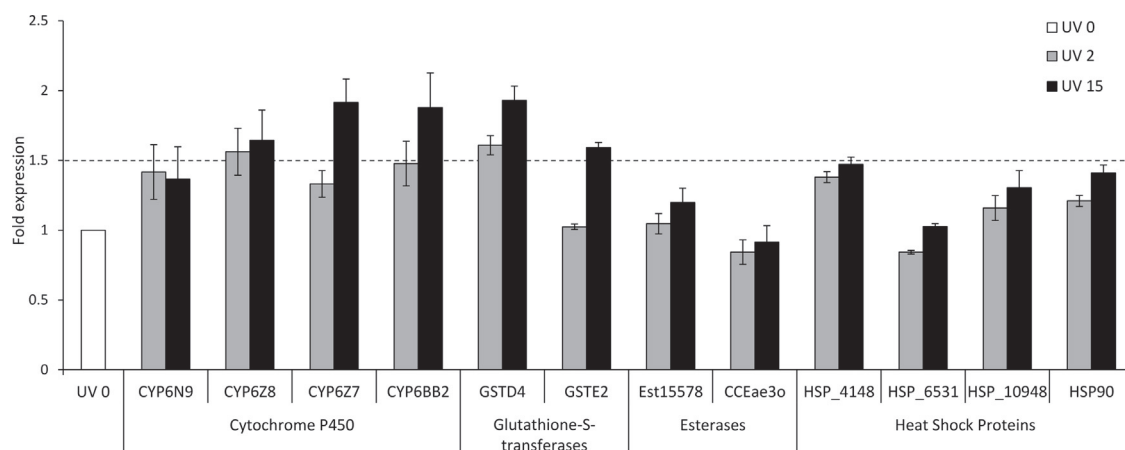


Fig. 3. Effect of UV on the expression of candidate genes. Real-time quantitative PCR analysis of the differential mRNA expression of twelve candidate genes in *Aedes aegypti* larvae exposed to 2 h ("UV 2") or 15 h ("UV 15") of ultraviolet relative to larvae non-exposed to UV ("UV 0"). mRNA expression values of the genes are indicated as the mean of three biological replicates for each condition of UV-exposure. Error: standard error. The threshold of 1.5-fold over-expression is indicated by a horizontal dotted line.

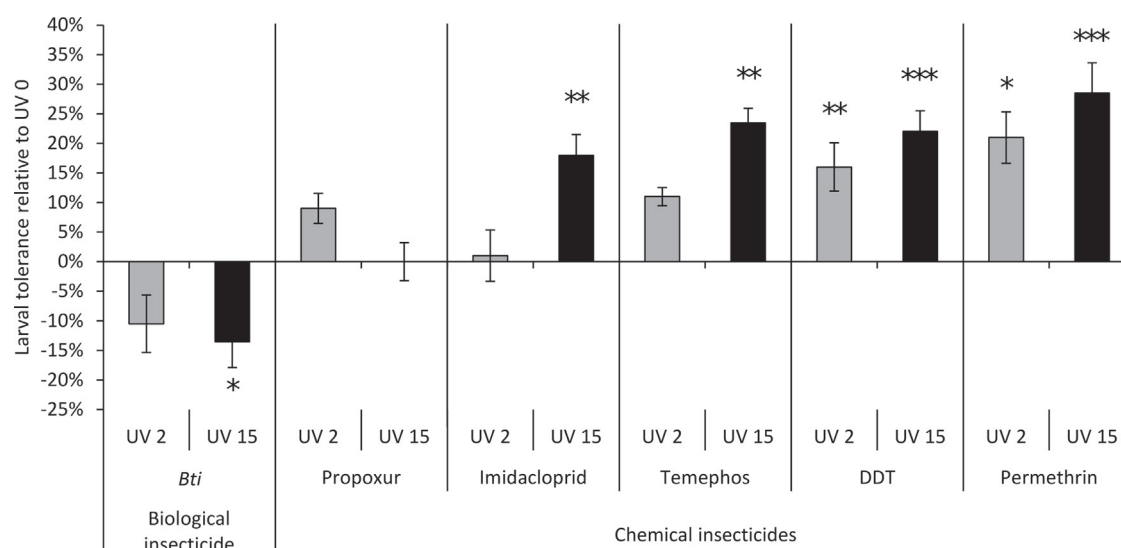


Fig. 4. Effect of UV on insecticide tolerance. Tolerance to *Bti*, propoxur, imidacloprid, temephos, DDT and permethrin of larvae exposed daily to 2 h UV light ("UV 2"; gray) or 15 h UV light ("UV 15"; black) relative to non UV-exposed larvae ("UV 0"). Relative tolerances were calculated by subtracting the percentage of mortality obtained with non UV-exposed larvae to the percentage of mortality obtained with UV-exposed larvae. Error: standard error. Statistical differences from UV 0 (one-way ANOVA): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

et al., 2008; Stevenson et al., 2011). More specifically, an over-transcription of three *CYP6* genes (*CYP6BB2*, *CYP6Z8* and *CYP6Z7*) was observed following UV exposure. *CYP6BB2* has been previously shown to be over-transcribed in mosquito strains resistant to imidacloprid and permethrin (Poupardin et al., 2012; Riaz et al., 2013; Saavedra-Rodriguez et al., 2012), while *CYP6Z7* was over-transcribed in an imidacloprid-resistant *Ae. aegypti* laboratory strain (Riaz et al., 2013). *CYP6Z8* has been associated with mosquito resistance to several chemical insecticides, including imidacloprid, temephos and the two pyrethroids permethrin and deltamethrin (Marcombe et al., 2012, 2009; Riaz et al., 2013; Saavedra-Rodriguez et al., 2012). The fluctuations of cytochrome P450 and other related enzyme activities upon UV exposure may be related to the generation of photoproducts. As described in mammals and fish, cytochromes P450 are strongly induced by agonists of aryl hydrocarbon receptors produced by the photoconversion of light sensitive amino acids, such as tryptophan (Behrendt et al., 2010). Two GST-coding genes (*GSTD4* and *GSTE2*) were also transcriptionally up-regulated upon UV exposure; *GSTD4* was previously found over-expressed in mosquito strains resistant to imidacloprid and permethrin (Poupardin et al., 2012; Riaz et al., 2013) while the over-expression of *GSTE2* was observed in temephos-, pyrethroid- and DDT-resistant mosquitoes (Lumjuan et al., 2005, 2011; Marcombe et al., 2012). Moreover, the implication of *GSTE2* in DDT resistance has been functionally validated by RNA interference experiments (Lumjuan et al., 2011). Altogether, these results suggest that the increased transcription of specific insecticide resistance genes upon UV exposure may lead to an increased tolerance to chemical insecticides.

The lower efficacy of chemical insecticides in UV-exposed compared to non-exposed mosquito breeding sites is generally attributed to the high degradation of chemicals when exposed to sunlight (Burrows et al., 2002; Laskowski, 2002). Of great significance, our results suggest that this low efficacy may also be partly due to the UV-induced higher metabolic tolerance of mosquito larvae to chemicals. Interestingly, in contrast to chemicals, UV light had an opposite effect on the susceptibility of mosquitoes to the bioinsecticide *Bti* (our data) and on the bioinsecticide itself; indeed, sunlight is known to strongly decrease the persistence of *Bti* insecticidal activity (Lacey, 2007), while the present work demonstrates that UV-exposed mosquitoes are more susceptible to *Bti*. Therefore,

Bti may be more efficient in open areas exposed to sunlight than in shaded breeding sites protected from UV, but for a shorter period of time. It may therefore be necessary to take into account such UV-dependent contrasting tolerance patterns for adapting chemical and biological insecticide treatments to sunlight exposure of mosquito breeding sites to be treated.

The UV-induced increase of detoxification enzyme activities and gene expression led to a contrasting pattern of tolerance between chemical and biological insecticides. These results are consistent with previous works reporting an over-transcription of *CYP6Z7* and/or *CYP6Z8* genes in mosquitoes resistant to chemical insecticides (David et al., 2013; Marcombe et al., 2012, 2009; Riaz et al., 2013; Saavedra-Rodriguez et al., 2012), whereas the same genes were found significantly under-transcribed in a *Bti*-resistant *Ae. aegypti* laboratory strain (Tetreau et al., 2012a). Detoxification enzymes are often involved in the degradation of small chemicals, such as insecticides, but they unlikely process large proteins like *Bti* toxins. Considering that detoxification activities represent an important energetic cost for insects and that their expression can be rapidly modulated by internal or external factors (Poupardin et al., 2008, 2012; Reynaud et al., 2008), the under-expression of these enzymes in the *Bti*-resistant strain may reflect compensatory mechanisms (Tetreau et al., 2012a). It is likely that anti-oxidant and detoxification enzyme overproduction in response to oxidative stress or photoproduct production in exposed larvae might have led to a decrease in resource allocations toward *Bti* resistance mechanisms. To our knowledge, this is the first experimental evidence that a metabolic tolerance to chemical insecticides is concomitant to a higher susceptibility of mosquito larvae to a biological insecticide. It supports the use of *Bti* as an efficient alternative to chemical insecticides when mosquito populations have developed a metabolic resistance to chemicals in the field.

Acknowledgments

The authors want to thank Thierry Gaudé for technical assistance. They also want to thank Patrick Meresse from the "Centre Universitaire de Biologie Expérimentale" (CUBE) for providing an unrestricted access to the microscopy platform. Guillaume Tetreau was supported by the University of Grenoble and Alexia

Chandor-Proust and Idir Akhouayri by the 'AvecNet' FP7 European project. Frédéric Faucon and Sophie Prud'homme were supported by the French Ministry of Research and Renaud Stalinski by the French Rhône-Alpes region.

References

- Ballare, C.L., Rousseaux, M.C., Searles, P.S., Zaller, J.G., Giordano, C.V., Robson, T.M., Caldwell, M.M., Sala, O.E., Scopel, A.L., 2001. Impacts of solar ultraviolet-B radiation on terrestrial ecosystems of Tierra del Fuego (southern Argentina) – an overview of recent progress. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 62, 67–77.
- Behrendt, L., Jonsson, M.E., Goldstone, J.V., Stegeman, J.J., 2010. Induction of cytochrome P450 1 genes and stress response genes in developing zebrafish exposed to ultraviolet radiation. *Aquatic Toxicology* 98, 74–82.
- Beketov, M.A., Speranza, A., Liess, M., 2011. Ultraviolet radiation increases sensitivity to pesticides: synergistic effects on population growth rate of *Daphnia magna* at low concentrations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 87, 231–237.
- Benedict, M.Q., Levine, R.S., Hawley, W.A., Lounibos, L.P., 2007. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7, 76–85.
- Bisset, J., Rodriguez, M.M., Fernandez, D., 2006. Selection of insensitive acetylcholinesterase as a resistance mechanism in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Santiago de Cuba. *Journal of Medical Entomology* 43, 1185–1189.
- Blanford, S., Chan, B.H., Jenkins, N., Sim, D., Turner, R.J., Read, A.F., Thomas, M.B., 2005. Fungal pathogen reduces potential for malaria transmission. *Science* 308, 1638–1641.
- Bravo, A., Likitvivatanavong, S., Gill, S.S., Soberon, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 423–431.
- Burrows, H.D., Canle, M., Santaballa, J.A., Steenken, S., 2002. Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 67, 71–108.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J., Wittwer, C.T., 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55, 611–622.
- Chiu, T.-L., Wen, Z., Rupasinghe, S.G., Schuler, M.A., 2008. Comparative molecular modeling of *Anopheles gambiae* CYP6Z1, a mosquito P450 capable of metabolizing DDT. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 8855–8860.
- Chouaibou, M., Etang, J., Brevault, T., Nwane, P., Hinzoumbe, C.K., Mimpoundi, R., Simard, F., 2008. Dynamics of insecticide resistance in the malaria vector *Anopheles gambiae* s.l. from an area of extensive cotton cultivation in Northern Cameroon. *Tropical Medicine and International Health* 13, 476–486.
- Christiansen, J.A., McAbee, R.D., Stanich, M.A., DeChant, P., Boronda, D., Cornel, A.J., 2004. Influence of temperature and concentration of Vectobac(R) on control of the salt-marsh mosquito, *Ochlerotatus squamiger*, in Monterey County, California. *Journal of the American Mosquito Control Association* 20, 165–170.
- Cirimotich, C.M., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G., 2011. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host and Microbe* 10, 307–310.
- Dahms, H.-U., Lee, J.-S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology* 97, 3–14.
- David, J.-P., Ismail, H.M., Chandor-Proust, A., Paine, M.J.I., 2013. Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* 368, 368, Article no.: 20120429.
- de Valdez, M.R.W., Nimmo, D., Betz, J., Gong, H.F., James, A.A., Alphey, L., Black, W.C., 2011. Genetic elimination of dengue vector mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 4772–4775.
- Diabate, A., Baldet, T., Chandre, F., Akogbeto, M., Guiguemde, T.R., Darriet, F., Brengues, C., Guillet, P., Hemingway, J., Small, G.J., Hougard, J.M., 2002. The role of agricultural use of insecticides in resistance to pyrethroids in *Anopheles gambiae* SL in Burkina Faso. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67, 617–622.
- Dubovskii, I.M., Grizanov, E.V., Chertkova, E.A., Slepneva, I.A., Komarov, D.A., Vorontsova, Y.L., Glupov, V.V., 2010. Generation of reactive oxygen species and activity of antioxidants in hemolymph of the moth larvae *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Piralidae) at development of the process of encapsulation. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 46, 35–43.
- Enayati, A., Hemingway, J., 2010. Malaria management: past, present, and future. *Annual Review of Entomology* 55, 569–591.
- Enayati, A.A., Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Insect glutathione transferases and insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* 14, 3–8.
- Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants and Redox Signaling* 15, 1583–1606.
- Goldberg, L.J., Margalit, J., 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles-sergentii*, *Uranotaenia-unguiculata*, *Culex-univittatus*, *Aedes-aegypti* and *Culex-pipiens*. *Mosquito News* 37, 355–361.
- Gubler, D.J., 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 480–496.
- Hemingway, J., 2000. The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 1009–1015.
- Hemingway, J., Beaty, B.J., Rowland, M., Scott, T.W., Sharp, B.L., 2006. The innovative vector control consortium: improved control of mosquito-borne diseases. *Trends in Parasitology* 22, 308–312.
- Hemingway, J., Ranson, H., 2000. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology* 45, 371–391.
- Heugens, E.H.W., Hendriks, A.J., Dekker, T., van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2001. A review of the effects of multiple stressors on aquatic organisms and analysis of uncertainty factors for use in risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 31, 247–284.
- Hidayati, H., Nazni, W.A., Lee, H.L., Sofian-Azirun, M., 2011. Insecticide resistance development in *Aedes aegypti* upon selection pressure with malathion. *Tropical Biomedicine* 28, 425–437.
- Ingram, A.J., 1992. Review of chemical and UV light-induced melanomas in experimental-animals in relation to human-melanoma incidence. *Journal of Applied Toxicology* 12, 39–43.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T., Neill, S.L.O., 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *Embo Reports* 12, 508–518.
- Kamgang, B., Marcombe, S., Chandre, F., Nchoutpouen, E., Nwane, P., Etang, J., Corbel, V., Paupy, C., 2011. Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Central Africa. *Parasites and Vectors* 4, Article no.: 79.
- Killeen, G.F., Fillinger, U., Knols, B.G.J., 2002. Advantages of larval control for African malaria vectors: low mobility and behavioural responsiveness of immature mosquito stages allow high effective coverage. *Malaria Journal* 1, Article no.: 8.
- Kim, R.-O., Rhee, J.-S., Won, E.-J., Lee, K.-W., Kang, C.-M., Lee, Y.-M., Lee, J.-S., 2011. Ultraviolet B retards growth, induces oxidative stress, and modulates DNA repair-related gene and heat shock protein gene expression in the monogonont rotifer, *Brachionus* sp. *Aquatic Toxicology* 101, 529–539.
- Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., Boukouvala, E., Papadopolou-Mourkidou, E., 2001. Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 31, 313–319.
- Lacey, L.A., 2007. *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of the American Mosquito Control Association* 23, 133–163.
- Lacey, L.A., Frutos, R., Kaya, H.K., Vail, P., 2001. Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biological Control* 21, 230–248.
- Laskowski, D.A., 2002. Physical and chemical properties of pyrethroids. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 174, 49–170.
- Liess, M., Champeau, O., Riddle, M., Schulz, R., Duquesne, S., 2001. Combined effects of ultraviolet-B radiation and food shortage on the sensitivity of the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* to copper. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2088–2092.
- Lumjuan, N., McCarroll, L., Prapanthadara, L.A., Hemingway, J., Ranson, H., 2005. Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 35, 861–871.
- Lumjuan, N., Rajatileka, S., Changsom, D., Wichee, J., Leelapat, P., Prapanthadara, L.-a., Somboon, P., Lycett, G., Ranson, H., 2011. The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 203–209.
- Marcombe, S., Mathieu, R.B., Pocquet, N., Riaz, M.-A., Poupardin, R., Selior, S., Darriet, F., Reynaud, S., Yebakima, A., Corbel, V., David, J.-P., Chandre, F., 2012. Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS ONE* 7, Article no.: 2.
- Marcombe, S., Poupardin, R., Darriet, F., Reynaud, S., Bonnet, J., Strode, C., Brengues, C., Yebakima, A., Ranson, H., Corbel, V., David, J.P., 2009. Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* 10, Article no.: 494.
- Mazza, C.A., Izaguirre, M.M., Zavala, J., Scopel, A.L., Ballare, C.L., 2002. Insect perception of ambient ultraviolet-B radiation. *Ecology Letters* 5, 722–726.
- Melo-Santos, M.A.V., Varjal-Melo, J.J.M., Araujo, A.P., Gomes, T.C.S., Paiva, M.H.S., Regis, L.N., Furtado, A.F., Magalhaes, T., Macoris, M.L.G., Andrigueti, M.T.M., Ayres, C.F.J., 2010. Resistance to the organophosphate temephos: Mechanisms, evolution and reversion in an *Aedes aegypti* laboratory strain from Brazil. *Acta Tropica* 113, 180–189.
- Mitchell, S.N., Stevenson, B.J., Muller, P., Wilding, C.S., Egyir-Yawson, A., Field, S.G., Hemingway, J., Paine, M.J.I., Ranson, H., Donnelly, M.J., 2012. Identification and validation of a gene causing cross-resistance between insecticide classes in *Anopheles gambiae* from Ghana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6147–6152.
- Mittal, P.K., Adak, T., Sharma, V.P., 1995. Effect of water pH on the larvicidal activity of Spherix (*Bacillus sphaericus*) and Bactoculicide (*Bacillus thuringiensis* H-14) against mosquitoes. *National Academy Science Letters – India* 18, 189–191.
- Mohan, M., Taneja, T.K., Sahdev, S., Mohareer, K., Begum, R., Athar, M., Sah, N.K., Hasnain, S.E., 2003. Antioxidants prevent UV-induced apoptosis by inhibiting mitochondrial cytochrome c release and caspase activation in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells. *Cell Biology International* 27, 483–490.
- Muller, P., Warr, E., Stevenson, B.J., Pignatelli, P.M., Morgan, J.C., Steven, A., Yawson, A.E., Mitchell, S.N., Ranson, H., Hemingway, J., Paine, M.J.I., Donnelly, M.J., 2008. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* Overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genetics* 4, Article no.: 11.

- Perera, M.D.B., Hemingway, J., Karunaratne, S.H.P.P., 2008. Multiple insecticide resistance mechanisms involving metabolic changes and insensitive target sites selected in anopheline vectors of malaria in Sri Lanka. *Malaria Journal* 7, Article no.: 168.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, e45.
- Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., Vontas, J., David, J.P., 2008. Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 540–551.
- Poupardin, R., Riaz, M.A., Jones, C.M., Chandor-Proust, A., Reynaud, S., David, J.P., 2012. Do pollutants affect insecticide-driven gene selection in mosquitoes? Experimental evidence from transcriptomics. *Aquatic Toxicology* 114–115, 49–57.
- Poupardin, R., Riaz, M.A., Vontas, J., David, J.P., Reynaud, S., 2010. Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 19, 185–193.
- R Development Core Team, 2007. R: a Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.R-project.org>
- Ranson, H., Hemingway, J., 2005. Mosquito glutathione transferases. In: Press, E.A. (Ed.), *Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases*, San Diego, p. 226.
- Reynaud, S., Duchiron, C., Deschaux, P., 2001. 3-methylcholanthrene increases phorbol 12-myristate 13-acetate-induced respiratory burst activity and intracellular calcium levels in common carp (*Cyprinus carpio* L.) macrophages. *Toxicology and Applied Pharmacology* 175, 1–9.
- Reynaud, S., Marionnet, D., Taysse, L., Duchiron, C., Deschaux, P., 2002. The effects of 3-methylcholanthrene on macrophage respiratory burst and biotransformation activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish and Shellfish Immunology* 12, 17–34.
- Reynaud, S., Raveton, M., Ravanel, P., 2008. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review. *Aquatic Toxicology* 87, 139–145.
- Riaz, M.A., Chandor-Proust, A., Dauphin-Villemant, C., Poupardin, R., Jones, C.M., Strode, C., Regent-Kloeckner, M., David, J.-P., Reynaud, S., 2013. Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 126, 326–337.
- Riaz, M.A., Poupardin, R., Reynaud, S., Strode, C., Ranson, H., David, J.P., 2009. Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquatic Toxicology* 93, 61–69.
- Roberts, R.J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., Sung, Y.Y., 2010. Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of Fish Diseases* 33, 789–801.
- Roh, J.Y., Choi, J.Y., Li, M.S., Jin, B.R., Je, Y.H., 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 547–559.
- Ross, R., 1901. Malaria and mosquitoes. *Nature* 63, 440.
- Saavedra-Rodriguez, K., Suarez, A.F., Salas, I.F., Strode, C., Ranson, H., Hemingway, J., Black, W.C., 2012. Transcription of detoxification genes after permethrin selection in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology* 21, 61–77.
- Sang, W., Ma, W.-H., Qiu, L., Zhu, Z.-H., Lei, C.-L., 2012. The involvement of heat shock protein and cytochrome P450 genes in response to UV-A exposure in the beetle *Tribolium castaneum*. *Journal of Insect Physiology* 58, 830–836.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R., Dean, D.H., 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 775–806.
- Scholtz, E.J., Ng'habi, K., Kihonda, J., Takken, W., Paaijmans, K., Abdulla, S., Killeen, G.F., Knols, B.G., 2005. An entomopathogenic fungus for control of adult African malaria mosquitoes. *Science* 308, 1641–1642.
- Scott, T.W., Takken, W., Knols, B.G.J., Boete, C., 2002. The ecology of genetically modified mosquitoes. *Science* 298, 117–119.
- Sibanda, M.M., Focke, W.W., Labuschagne, F.J.W.J., Moyo, L., Nhlapo, N.S., Maity, A., Muiambo, H., Massinga Jr., P., Crowther, N.A.S., Coetzee, M., Brindley, G.W.A., 2011. Degradation of insecticides used for indoor spraying in malaria control and possible solutions. *Malaria Journal* 10, Article no.: 307.
- Soderlund, D.M., 2008. Pyrethroids, knockdown resistance and sodium channels. *Pest Management Science* 64, 610–616.
- Stevenson, B.J., Bibby, J., Pignatelli, P., Muangnoicharoen, S., O'Neill, P.M., Lian, L.-Y., Mueller, P., Nikou, D., Steven, A., Hemingway, J., Sutcliffe, M.J., Paine, M.J.I., 2011. Cytochrome P450 6M2 from the malaria vector *Anopheles gambiae* metabolizes pyrethroids: sequential metabolism of deltamethrin revealed. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 492–502.
- Tetreau, G., Bayyareddy, K., Jones, C.M., Stalinski, R., Riaz, M.A., Paris, M., David, J.P., Adang, M.J., Despres, L., 2012a. Larval midgut modifications associated with *Bti* Resistance in the yellow fever mosquito using proteomic and transcriptomic approaches. *BMC Genomics* 13, Article no.: 248.
- Tetreau, G., Stalinski, R., Kersusan, D., Veyrenc, S., David, J.P., Reynaud, S., Despres, L., 2012b. Decreased toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquito larvae after contact with leaf litter. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 5189–5195.
- Tomori, O., 2004. Yellow fever: the recurring plague. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 41, 391–427.
- Vachon, V., Laprade, R., Schwartz, J.L., 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *Journal of Invertebrate Pathology* 111, 1–12.
- Van Asperen, K., 1962. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *Journal of Insect Physiology* 8, 401–408.
- Vontas, J.G., Small, G.J., Nikou, D.C., Ranson, H., Hemingway, J., 2002. Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Biochemical Journal* 362, 329–337.
- Wang, S.Q., Setlow, R., Berwick, M., Polsky, D., Marghoob, A.A., Kopf, A.W., Bart, R.S., 2001. Ultraviolet A and melanoma: a review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 44, 837–846.
- Yamashita, Y., Ikeda, T., Matsuda, M., Maji, D., Hoshino, T., Mizushima, T., 2012. Purification and characterization of HSP-inducers from *Eupatorium lindleyanum*. *Biochemical Pharmacology* 83, 909–922.
- Yang, Y.-Y., Liu, Y., Teng, H.-J., Sauman, I., Sehna, F., Lee, H.-J., 2010. Circadian control of permethrin-resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology* 56, 1219–1223.
- Zhao, L., Jones, W.A., 2012. Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. *ISJ-Invertebrate Survival Journal* 9, 93–101.

Annexe III :

Chemical and biological insecticides select distinct gene expression patterns in *Aedes aegypti* mosquito.

CrossMark
click for updates

Research

Cite this article: Després L *et al.* 2014
Chemical and biological insecticides select
distinct gene expression patterns in *Aedes*
aegypti mosquito. *Biol. Lett.* **10**: 20140716.
<http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2014.0716>

Received: 4 September 2014

Accepted: 26 November 2014

Subject Areas:

evolution, molecular biology, ecology

Keywords:transcriptomics, cross resistance, detoxification,
immunity**Author for correspondence:**

Laurence Després

e-mail: laurence.despres@ujf-grenoble.fr

[†]Present address: Department of Entomology,
University College of Agriculture, University of
Sargodha, Sargodha, Pakistan.

Electronic supplementary material is available
at <http://dx.doi.org/10.1098/rsbl.2014.0716> or
via <http://rsbl.royalsocietypublishing.org>.

Evolutionary biology

Chemical and biological insecticides select
distinct gene expression patterns in *Aedes*
aegypti mosquito

Laurence Després^{1,2}, Renaud Stalinski^{1,2}, Frédéric Faucon^{1,2}, Vincent Navratil³,
Alain Viari⁴, Margot Paris^{1,2}, Guillaume Tetreau^{1,2}, Rodolphe Poupardin^{1,2},
Muhammad Asam Riaz^{1,2,†}, Aurélie Bonin^{1,2}, Stéphane Reynaud^{1,2}
and Jean-Philippe David^{1,2}

¹Université Grenoble-Alpes, Laboratoire d'Ecologie Alpine UMR 5553, BP53, Grenoble 38041, France²CNRS, Laboratoire d'Ecologie Alpine UMR 5553, BP53, Grenoble 38041, France³Pôle Rhône-Alpes de Bioinformatique, Université de Lyon, Lyon 69000, France⁴INRIA Grenoble Rhône-Alpes, Montbonnot-Saint-Martin 38330, France

Worldwide evolution of mosquito resistance to chemical insecticides represents a major challenge for public health, and the future of vector control largely relies on the development of biological insecticides that can be used in combination with chemicals (integrated management), with the expectation that populations already resistant to chemicals will not become readily resistant to biological insecticides. However, little is known about the metabolic pathways affected by selection with chemical or biological insecticides. Here we show that *Aedes aegypti*, a laboratory mosquito strain selected with a biological insecticide (*Bacillus thuringiensis israelensis*, Bti) evolved increased transcription of many genes coding for endopeptidases while most genes coding for detoxification enzymes were under-expressed. By contrast, in strains selected with chemicals, genes encoding detoxification enzymes were mostly over-expressed. In all the resistant strains, genes involved in immune response were under-transcribed, suggesting that basal immunity might be a general adjustment variable to compensate metabolic costs caused by insecticide selection. Bioassays generally showed no evidence for an increased susceptibility of selected strains towards the other insecticide type, and all chemical-resistant strains were as susceptible to Bti as the unselected parent strain, which is a good premise for sustainable integrated management of mosquito populations resistant to chemicals.

1. Introduction

The massive use of chemical insecticides against mosquitoes has led to the evolution and spread of resistance to all known families of chemical insecticides. Nowadays, mosquito control is progressively shifting from a chemical-only to an integrated control strategy, involving the combination of biological insecticides against larvae and chemical insecticides mostly against adults [1]. The sustainability of such strategy relies on the supposedly different mechanisms underlying resistance to chemical and to biological insecticides, and on the premise that mosquitoes will not be able to simultaneously evolve resistance to both insecticides (cross-resistance). The rationale of using a combination of biological and chemical insecticides is that genes and metabolic pathways involved in the adaptive response to chemicals differ from those involved in response to a biological insecticide. In the present report, we tested this assumption by selecting a laboratory strain of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* with a biological insecticide or with one of three chemical insecticides for several generations (electronic supplementary

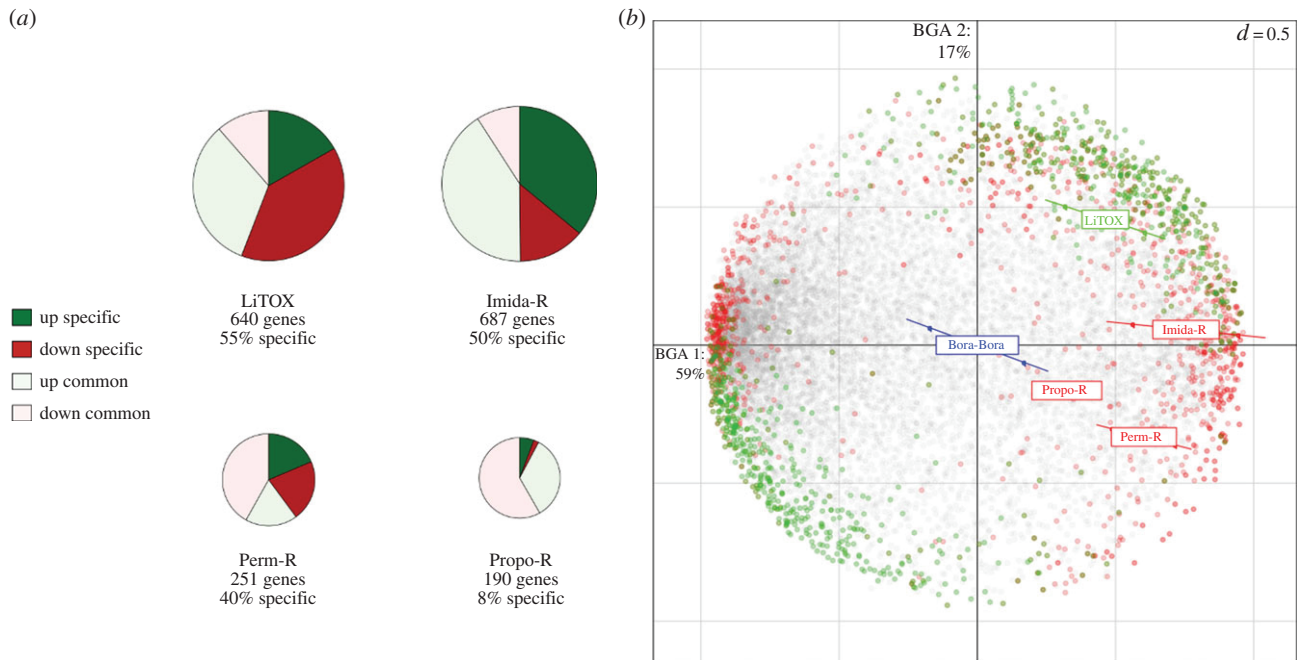


Figure 1. (a) Number of genes down (red) or up (green) differentially transcribed in each insecticide-selected strain, and (b) between-group analysis (BGA) based on \log_2 transcription ratios (as compared to the average between the two Bora-Bora replicates) for each library. Simultaneous plots of the gene (large dots) and library (small dots) points on the first two axes of the BGA. Library points associated to the same strain are joined by line and labelled accordingly. Genes differentially expressed (up or down) in LiTOX strain are in green, genes differentially expressed in at least one of the chemical-selected strain are in red. Genes not differentially expressed are in grey.

material, table S1), and we compared their transcriptomic profiles. To our knowledge, this is the first time that the difference between adaptation to chemical and biological insecticides has been investigated at the whole transcriptome level. Our approach is innovative as it gives a global view of how distinct functional groups of genes are affected by different challenges. We further tested cross-resistance profiles by exposing two chemical-resistant strains to *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti), and three strains resistant to Bti-toxins to permethrin, propoxur and imidacloprid.

2. Material and methods

Seven *A. aegypti* strains were selected from the parent Bora-Bora strain susceptible to all insecticides. Three strains (Perm-R, Imida-R and Propo-R) were selected with three insecticides, each representative of one main class of insecticide currently in use: permethrin (pyrethroid), imidacloprid (neonicotinoid), propoxur (carbamate) [2], and four strains (LiTOX, LR4A, LR4B, LR11) were selected, respectively, using field-collected leaf litters containing persistent Bti, and with the three main toxins produced by Bti: Cry4Aa, Cry4Ba and Cry11Aa [3,4] (electronic supplementary material, table S1). Each line was selected independently from the susceptible Bora-Bora strain [2–4], resulting in three replicates for the chemical-resistant lines and four replicates for the Bt-resistant lines, all sharing a common genetic background and bred in the same standard insectarium conditions. Although all significant, the resistance ratios obtained after 11–26 generations of selection were moderate, especially for chemical-selected strains, which suggests metabolic resistance rather than target-site resistance. For RNAseq, five strains were analysed: the parent Bora-Bora strain, the three chemical-selected strains and the LiTOX strain. For each strain, total RNA was extracted from 180 pooled larvae, and two distinct cDNA libraries were constructed and sequenced. The TopHat program was applied to align the short reads (unique mapping) to AagL2.1 reference genome. HTSeq software was

used to compute the number of reads overlapping Vectorbase gene features, and genes with more than 20 reads in at least one library were retained for further analysis. The Bioconductor package DESeq was used to normalize read count and test for differential expression between strains (false discovery rate < 0.01). For each resistant strain and each differential expression state, significantly enriched gene ontology (GO) terms were determined using a hypergeometric test with a (one-tailed) $p < 0.005$. To test for cross-resistance between insecticides, bioassays were performed on third instar larvae using Bti on Perm-R and Imida-R strains, and using permethrin, propoxur and imidacloprid on LR4A, LR4B and LR11 strains. Bioassays have been performed on pools of 20 larvae in 50 ml tap water (WHO protocol), using a diagnostic dose determined empirically for each insecticide in order to kill half of the susceptible reference strain. For each insecticide, a strain effect was tested on the number of dead larvae after 24 h (18 replicates per strain, Kruskal–Wallis test) followed by Mann–Whitney pairwise comparisons with Bonferroni correction for multiple tests.

3. Results and discussion

A total of 12 116 of the 15 784 *A. aegypti* genes were detected (76.8%), among which 1196 were differentially transcribed in at least one selected strain (electronic supplementary material, table S2). The LiTOX strain exhibited the most specific response (figure 1a) and was clearly separated from the chemical-selected strains (figure 1b), indicating that biological and chemical insecticides select for altered transcription of different sets of genes. Our aim in this paper was not to go down to the precise gene involved in each resistance type, but to evaluate differences in the overall pattern of expression of the main metabolic pathways selected with biological versus chemical insecticides. Selecting with Bti resulted in an overall increased expression of genes involved in endopeptidase activity while genes involved in detoxification were mostly under-transcribed

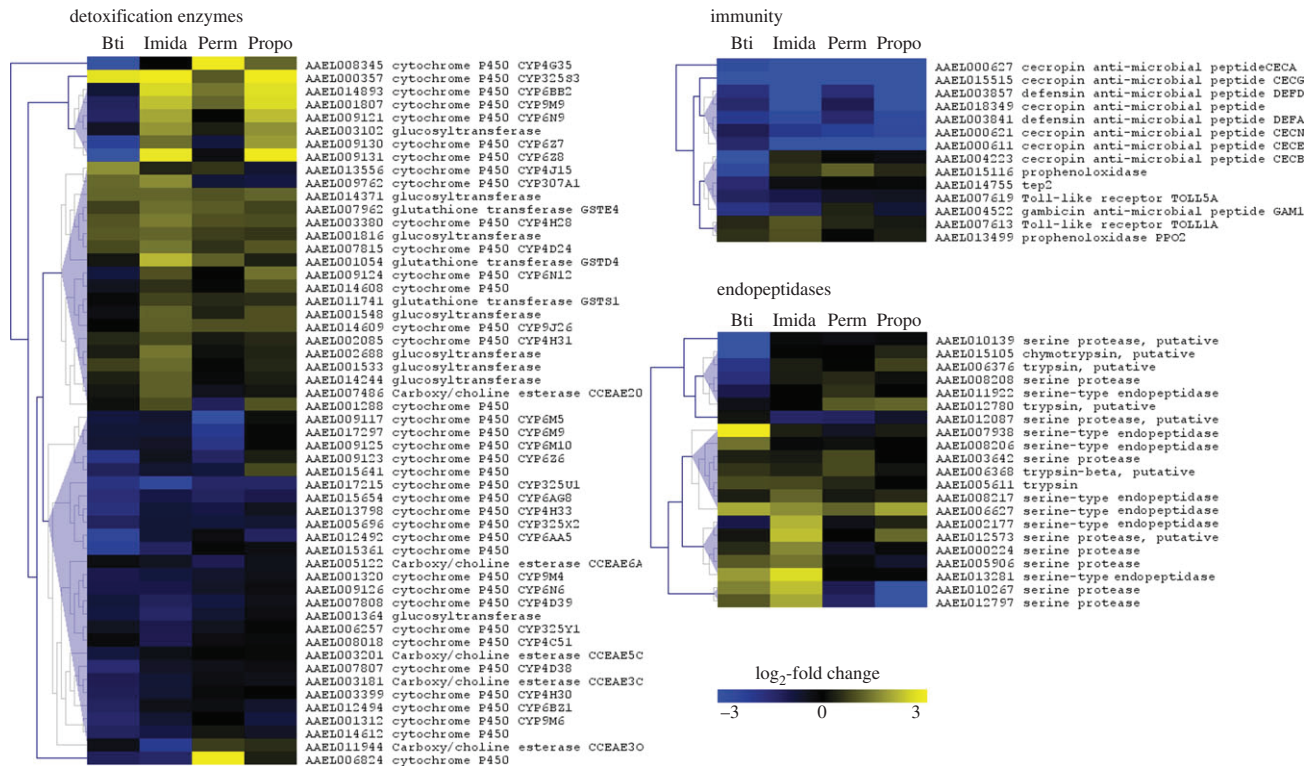


Figure 2. Representation of genes significantly differentially transcribed in at least one selected strain for three biological categories of genes: 'Detoxification enzymes', 'Immunity' and 'Endopeptidases'. The colour scale corresponds to log₂ transcription ratio as compared to the susceptible strain. Significant values in electronic supplementary material, table S2.

Table 1. Summary of GO terms enriched in lists of genes significantly downregulated or upregulated in each selected strain. Formatting for GO terms corresponds to immunity process (italics), detoxification process (bold), chitin/cuticle metabolism (bold italics) and endopeptidase activity (underline). See electronic supplementary material, table S3 for more details.

strain	insecticide (family)	downregulated	upregulated
Perm-R	Permethrin (pyrethroid)	<i>structural constituent of cuticle;</i> <i>innate immune response;</i> <i>defense response to bacterium</i>	<i>alkaline phosphatase activity</i>
Imida-R	Imidacloprid (neonicotinoid)	<i>innate immune response;</i> <i>defense response to bacterium</i>	<i>chitin binding and metabolic process;</i> <i>structural constituent of cuticle;</i> <i>haeme binding;</i> <i>oxidoreductase activity</i>
Propo-R	Propoxur (carbamate)	<i>innate immune response;</i> <i>defense response to bacterium</i>	<i>structural constituent of cuticle;</i> <i>monooxygenase activity;</i> <i>haeme binding;</i> <i>electron carrier activity;</i> <i>oxidation reduction</i>
LiTOX	Bti (bacterio-insecticide)	<i>monooxygenase activity;</i> <i>oxydation reduction;</i> <i>haeme binding</i>	<i>structural constituent of cuticle;</i> <i>chitin binding and metabolic process;</i> <i>serine-type endopeptidase activity</i>

(table 1; electronic supplementary material, table S3). By contrast, in chemically selected strains, detoxification enzymes were mostly over-expressed, with no alteration of endopeptidase gene transcription (figure 2). The increased expression of detoxification enzymes in mosquitoes resistant to chemicals has been validated by biochemical tests in the Imida-R laboratory strain [5] and also on organophosphate- and pyrethroid-resistant field populations [6]. The toxins produced by

Bti are large proteins, while chemical insecticides are small lipophilic molecules, and their degradation involves different metabolic pathways. *Bacillus thuringiensis* toxins are degraded by endopeptidases [7,8], while chemical insecticides are usually metabolized by detoxification enzymes such as cytochrome P450 monooxygenases, esterases, glutathione S-transferases and glucosyl-transferases [5,9]. The finding of increased transcription for many genes coding for endopeptidases in the

Table 2. Fold change of differently transcribed immune genes in selected strains compared with control.

			normalized read counts per strain					fold change compared with control ^a			
Vectorbase ID	name	description	Bora-Bora	LiTOX	Imida-R	Perm-R	Propo-R	LiTOX	Imida-R	Perm-R	Propo-R
humoral response											
anti-microbial peptides											
AAEL000611	CECE	Cecropin	114.3	43.3	8.3	13.2	14.1	−2.6	−13.8	−8.7	−8.1
AAEL000621	CECN	Cecropin	79.9	37.6	20.5	17.2	14.5	−2.1	−3.9	−4.6	−5.5
AAEL000627	CECA	Cecropin	20.88	3.23	0.00	0.00	0.44	−6.5	−Inf	−Inf	−47.5
AAEL004223	CECB	Cecropin	37.5	3.6	51.5	39.3	31.2	−10.4	1.4	1.0	−1.2
AAEL015515	CECG	Cecropin	19.5	2.3	0.5	2.2	1.5	−8.7	−41.3	−8.8	−13.4
AAEL003857	DEFD	Defensin	280.9	85.0	15.4	92.4	16.7	−3.3	−18.3	−3.0	−16.8
AAEL003841	DEFA	Defensin	138.4	34.4	22.9	51.0	23.6	−4.0	−6.1	−2.7	−5.9
AAEL004522	GAM1	Gambicin	45.0	12.9	16.8	58.9	27.3	−3.5	−2.7	1.3	−1.7
AAEL018349		Cecropin	20.9	7.8	1.8	9.9	1.0	−2.7	−11.8	−2.1	−20.5
toll pathway											
AAEL007613	TOLL1A	Toll-like receptor	238.2	329.2	477.4	322.0	278.8	1.4	2.0	1.4	1.2
AAEL007619	TOLL5A	Toll-like receptor	2515.8	1075.2	1319.7	1782.5	1856.1	−2.3	−1.9	−1.4	−1.4
cellular response											
recognition											
AAEL014755		tep2	1275.2	454.5	1041.7	1321.2	1188.8	−2.8	−1.2	1.0	−1.1
melanization											
AAEL013499	PPO2	Prophenoloxydase	1005.5	1507.6	1914.5	1041.7	1257.2	1.5	1.9	1.0	1.3
AAEL015116		Prophenoloxydase	289.7	52.2	446.0	649.0	402.3	−5.5	1.5	2.2	1.4

^aValues in bold character: FDR ≤ 0.01; −Inf: no reads were detected in the selected strain.

LiTOX strain is in line with a previous work showing a global increase in proteolytic activities in the midgut of LiTOX larvae [10]. The fact that most detoxification enzymes were under-transcribed in the LiTOX strain, together with an increase in endopeptidase activity, suggests that there might be metabolic costs to constitutively produce these two types of enzymes simultaneously. In agreement with a resource-based metabolic trade-off associated with Bti resistance, high fitness costs were measured in the LiTOX strain in all life-stages (longer developmental time, lower fecundity and egg survival [11]).

Our data also revealed an under-transcription of genes related to immunity in all selected strains (table 2; figure 2). Immune response was shown to involve both physiological and evolutionary costs [12], and the under-transcription of immune genes in chemical-resistant strains could reflect a re-investment from immunity toward detoxification pathways in the absence of bacterial challenge in laboratory conditions. More surprisingly, we observed the same trend in the LiTOX strain, which was exposed in each generation to a Gram-positive bacterium. *Bacillus thuringiensis* toxins and spores are ingested by insect larvae, but it is not clear whether the action of toxins alone (disruption of the gut epithelium) is sufficient for mortality to occur, or if germination of spores in larval haemolymph is required [13]. In our dataset, two prophenoloxydases (PPO, involved in melanization) and four genes coding for anti-microbial peptides were significantly under-transcribed in the LiTOX strain (table 2), and none were over-transcribed. In line with this, the basal immunity of a Bt-resistant cabbage looper line was shown to be lower than its susceptible counterpart [14], and we also observed a lower basal immunity in strains selected with Bti-toxins as compared with the susceptible strain (data not shown). This suggests that the depressed immunity observed in Bt-resistant insects is explained by the high cost of expression of immune genes.

The under-expression of genes involved in detoxifying activities observed in the LiTOX strain suggested that Bt-resistant strains might be more susceptible to chemical insecticides than the control strain. However, bioassays revealed that the strains selected with Bti-toxins show a mixed picture with respect to insecticide susceptibility. Although strains resistant to Bti-toxins were generally as susceptible as the reference strain to chemicals, one strain exhibited an increased susceptibility to one chemical (LR4B to propoxur), while two others had an increased tolerance to two chemicals (LR4A and LR11 to permethrin (pyrethroid) and LR4A to imidacloprid; electronic supplementary material, figure S1). Cross-resistance between the pyrethroid deltamethrin and *B. thuringiensis* Cry1Ac toxin was reported in the diamondback moth (*Plutella xylostella*), suggesting a common resistance mechanism to these two insecticides [15]. The toxicity of Cry1Ac and deltamethrin against the respective resistant lines was significantly increased by an inhibitor of insect esterases, but such synergism was not observed in

the unselected line, suggesting that selected and induced responses to insecticide exposure rely on different mechanisms. A recent study revealed that UV-exposed mosquitoes (Bora-Bora strain) exhibited higher levels of detoxification activities and were more tolerant to chemical insecticides, but more susceptible to Bti-toxins [16], suggesting an immediate metabolic compensation between detoxifying activity and Bti resistance in the susceptible strain. However, in this study, Bti-selected strains were not more susceptible to chemical insecticides than the control strain, again suggesting that long-term evolutionary compensation and short-term metabolic response to insecticide exposure can involve distinct mechanisms. This might partly explain the variability of outcomes observed with each combination of selected strain and chemicals. Furthermore, a fraction of detoxification enzymes usually contribute to a given chemical degradation [2,5], while others have endogenous functions potentially interacting with Bti-toxins tolerance. In addition, other protein families are probably involved in resistance to chemicals such as transporters, cuticle proteins and receptors [2] and may have been impacted by Bti selection. All the chemical-selected strains were as susceptible as the parent strain to Bti (electronic supplementary material, figure S1). This is in line with a lack of resistance (but no higher susceptibility) to Bti observed in field populations of *A. aegypti* highly resistant to chemical insecticides [17]. Furthermore, our result can be extended to a broader range of mosquito species and bioinsecticides as under-transcription of detoxification enzymes together with lack of cross-resistance were observed in pyrethroid-resistant *Anopheles* strains infected with *Beauveria bassiana*, an entomopathogenic fungus producing a cocktail of toxins [18]. This is a good premise for the use of biological agents against chemical-resistant field mosquito populations. Because we have generated only one selected line per insecticide, we cannot determine whether or not the transcriptional patterns observed reflect inherent random variation or the variation caused by our selection regimes, although they are consistent with data obtained from other laboratories [6,9,14,15,18]. To better understand the interplay between immunity, basal and induced detoxification activities, and response to a biological agent, future work should explore the immune and resistance status of target mosquito populations together with induced responses prior to introduction of a new bioinsecticide in integrated vector management.

Data accessibility. RNAseq data are available at EBI/SRA/ArrayExpress (accession number E-MTAB-1635).

Acknowledgements. We thank the BEeSy project (University Grenoble-Alpes) for computing and laboratory facilities and S. Veyrenc and T. Gaude for help with mosquito rearing.

Funding statement. This work was funded by the French National Research Agency (ANR-08-CES-006-01 DIBBECO and ANR-07SEST014 Mosquito-Env) and the region Rhône-Alpes.

References

1. WHO. 2007 *Report of the WHO consultation on integrated vector management (IVM)*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
2. David JP, Faucon F, Chandor-Proust A, Poupardin R, Riaz MA, Bonin A, Navratil V, Reynaud S. 2014 Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing. *BMC Genomics* **15**, 174. (doi:10.1186/1471-2164-15-174)
3. Paris M, Tetreau G, Laurent F, Lelu M, Despres L, David J-P. 2011 Persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) in the environment induces resistance to multiple Bti toxins in mosquitoes. *Pest Manag. Sci.* **67**, 122–128. (doi:10.1002/ps.2046)
4. Stalinski R, Tetreau G, Gaude T, Després L. 2014 Pre-selecting resistance against individual Bti Cry toxins facilitates the development of resistance to the Bti

- toxins cocktail. *J. Invert. Pathol.* **119**, 50–53. (doi:10.1016/j.jip.2014.04.002)
5. Riaz MA, Chandor-Proust A, Dauphin-Villemant C, Poupardin R, Jones CM, Strode C, Regent-Kloeckner M, David J-P, Reynaud S. 2013 Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquat. Toxicol.* **126**, 326–337. (doi:10.1016/j.aquatox.2012.09.010)
 6. Marcombe S *et al.* 2009 Exploring the molecular basis of insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti*: a case study in Martinique Island (French West Indies). *BMC Genomics* **10**, 494. (doi:10.1186/1471-2164-10-494)
 7. Forcada C, Alcacer E, Garcera MD, Martinez R. 1996 Differences in the midgut proteolytic activity of two *Heliothis virescens* strains, one susceptible and one resistant to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **31**, 257–272. (doi:10.1002/(SICI)1520-6327(1996)31:3<257::AID-ARCH2>3.0.CO;2-V)
 8. Bah A, van Frankenhuyzen K, Brousseau R, Masson L. 2004 The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *J. Invert. Pathol.* **85**, 120–127. (doi:10.1016/j.jip.2004.02.002)
 9. Che-Mendoza A, Penilla RP, Americo Rodriguez D. 2009 Insecticide resistance and glutathione S-transferases in mosquitoes: a review. *Afr. J. Biotechnol.* **8**, 1386–1397. (doi:10.5897/AJB2009.000-9218)
 10. Tetreau G, Stalinski R, David JP, Despres L. 2013 Increase in larval gut proteolytic activities and *Bti* resistance in the dengue fever mosquito. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **82**, 71–83. (doi:10.1002/arch.21076)
 11. Paris M, David J-P, Despres L. 2011 Fitness costs of resistance to *Bti* toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Ecotoxicology* **20**, 1184–1194. (doi:10.1007/s10646-011-0663-8)
 12. McKean KA, Yourth CP, Lazzaro BP, Clark AG. 2008 The evolutionary costs of immunological maintenance and deployment. *BMC Evol. Biol.* **8**, 76. (doi:10.1186/1471-2148-8-76)
 13. Raymond B, Johnston PR, Nielsen-LeRoux C, Lereclus D, Crickmore N. 2010 *Bacillus thuringiensis*: an impotent pathogen? *Trends Microbiol.* **18**, 189–194. (doi:10.1016/j.tim.2010.02.006)
 14. Ericsson JD, Janmaat AF, Lowenberger C, Myers JH. 2009 Is decreased generalized immunity a cost of *Bt* resistance in cabbage loopers *Trichoplusia ni*? *J. Invert. Pathol.* **100**, 61–67. (doi:10.1016/j.jip.2008.10.007)
 15. Sayyed AH, Moores G, Crickmore N, Wright DJ. 2009 Cross-resistance between a *Bacillus thuringiensis* Cry toxin and non-*Bt* insecticides in the diamondback moth. *Pest Manag. Sci.* **64**, 813–819. (doi:10.1002/ps.1570)
 16. Tetreau G, Chandor-Proust A, Faucon F, Stalinski R, Akhouayri I, Prud'homme SM, Raveton M, Reynaud S. 2013 Contrasting patterns of tolerance between chemical and biological insecticides in mosquitoes exposed to UV-A. *Aquat. Toxicol.* **140**, 389–397. (doi:10.1016/j.aquatox.2013.07.004)
 17. Marcombe S *et al.* 2012 Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS ONE* **7**, e30989. (doi:10.1371/journal.pone.0030989)
 18. Nardini L, Blanford S, Coetzee M, Koekemoer LL. 2014 Effect of *Beauveria bassiana* infection on detoxification enzyme transcription in pyrethroid resistant *Anopheles arabiensis*: a preliminary study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **108**, 221–227. (doi:10.1093/trstmh/tru021)

Résumé

La résistance des moustiques aux insecticides pyréthroïdes (PYRs) menace les programmes de lutte antivectorielle à l'échelle mondiale. Chez le moustique *Aedes aegypti*, vecteur de la dengue et du Chikungunya, les principaux mécanismes causant cette résistance sont la modification des cibles des insecticides et la résistance métabolique. Parmi ces mécanismes, la résistance métabolique consiste en une biodégradation accrue de l'insecticide par des enzymes de détoxification. Contrairement aux modifications de cibles, les bases moléculaires de ce mécanisme de résistance ne sont que partiellement connues. La plupart des gènes impliqués dans la résistance métabolique aux PYRs ont été identifiés par des approches transcriptomiques basées sur leur sur-expression dans les populations résistantes, mais les modifications génomiques à l'origine de ces variations d'expression ainsi que les modifications structurales de ces enzymes en lien avec la résistance restent méconnues. Dans ce cadre, la présente thèse vise à utiliser les nouvelles approches de séquençage à haut débit (NGS) pour caractériser les mécanismes moléculaires de la résistance aux PYRs chez le moustique *Ae. Aegypti*.

La première partie de la thèse présente une étude pilote RNA-seq menée sur des populations de laboratoire sélectionnées avec des insecticides. Cette étude a pour objectif d'évaluer les avantages des NGS pour l'étude des mécanismes de résistance chez les moustiques. Le rôle des enzymes de détoxification dans la résistance a ainsi été clairement confirmé. Plusieurs gènes codant pour ces enzymes apparaissent sur-exprimés dans les populations résistantes et un important regroupement de P450 montre une forte empreinte de sélection en lien avec la résistance aux PYRs.

La seconde partie de la thèse présente une étude sur des populations naturelles échantillonnées sur divers continents. Cette étude combine les technologies d'enrichissement génomique (ciblant près de 800 gènes potentiellement impliqués dans la résistance) et de DNA-seq afin d'étudier finement les variations génomiques liées à la résistance au PYR deltaméthrine. La comparaison de la couverture de séquençage entre populations résistantes et sensibles a permis d'identifier des variations de nombre de copies (CNVs) de certains gènes de détoxification fortement associées à la résistance à la deltaméthrine. Des mutations non-synonymes fortement liées au phénotype de résistance ont également été mises en évidence. La comparaison de ces marqueurs de la résistance entre les populations d'origines géographiques différentes a révélé que les gènes/mutations associés à la résistance à la deltaméthrine sont peu conservés entre continents, probablement à cause des différences de fond génétique des populations, de leur histoire démographique et des pressions de sélections.

La troisième partie de la thèse décrit une étude par RNA-seq portant sur les mêmes populations naturelles, visant à croiser des données de transcriptomique (expression des gènes et polymorphisme des transcrits) avec les données génomiques générées par l'étude précédente. Plusieurs enzymes de détoxications ont été retrouvées sur-exprimées chez les populations résistantes en lien avec les CNVs précédemment identifiées. Des centaines de variations de polymorphisme ont été identifiées par DNA-seq dans les zones *cis*-promotrices des différents gènes étudiés. Parmi ces variations, plusieurs apparaissent associées à la sur-régulation d'enzymes de détoxification dans les populations résistantes. Enfin, la comparaison des données de polymorphismes obtenues par DNA-seq et RNA-seq a permis d'étudier les phénomènes d'expression d'allèles spécifiques en lien avec la résistance. Cette étude confirme l'intérêt de croiser des données de transcriptomique et de génomique pour caractériser les bases moléculaires de la résistance aux insecticides.

D'un point de vue général, cette thèse permet de mieux appréhender les mécanismes de résistance du moustique *Ae. aegypti* aux PYRs mais aussi d'identifier de nouveaux marqueurs de la résistance potentiellement utilisables pour développer de nouveaux outils moléculaires diagnostiques de la résistance sur le terrain. Ce travail met également en avant les apports des NGS pour l'étude fine des bases moléculaires de l'adaptation d'organismes modèles.

Abstract

Mosquito control programs worldwide are increasingly threatened by resistance to pyrethroid insecticides (PYRs). In the dengue and chikungunya vector *Aedes aegypti*, the key resistance mechanisms include modifications in the protein targeted by insecticides (target-site mutations) and metabolic resistance, consisting in an increased insecticide biodegradation by so called detoxification enzymes. However, as opposed to target-site mutations, the molecular basis of metabolic resistance remains poorly understood. Most metabolic resistance genes have been detected by transcriptomic approaches based on their over-expressed in resistant populations, but genomic changes leading to these expression changes as well as structural changes in enzymes potentially involved in resistance remain unknown. In this context, this thesis aims at using next-generation sequencing approaches for characterizing PYR resistance mechanisms in the mosquito *Ae. aegypti*.

The first chapter of this thesis describes a pilot study on laboratory insecticide-selected populations of *Ae. aegypti*. This study aims at investigating the benefits of next-generation sequencing for studying resistance mechanisms in mosquitoes. This study confirmed that detoxification enzymes play a key role in resistance, with several of them being over-expressed in resistant populations and a large cluster of cytochrome P450 genes showing a selection imprint associated with resistance to PYRs.

The second chapter of this thesis describes a study conducted on natural mosquito populations from various continents. Combining genomic target enrichment (targeting about 800 genes potentially involved in resistance) and DNA-seq allowed unravelling genomic changes associated with resistance to the PYR deltamethrin. Comparing normalized sequencing coverage between resistant and susceptible populations identified significant copy number variations (CNVs) in several detoxification genes strongly associated to deltamethrin resistance. Non-synonymous mutations affecting detoxification enzymes associated to the resistance phenotype were also detected. Comparing resistance markers between populations from various continents revealed that genes/mutations associated with deltamethrin resistance are poorly conserved across continents, probably due to differences in the genetic background of populations but also differences in terms of demographic history and selection pressures.

The third chapter describes an RNA-seq study performed on the same natural mosquito populations in order to cross-link transcriptomic data (gene expression and transcript polymorphism) with genomic data obtained from the previous study. Multiple detoxification enzymes were found over-transcribed in resistant populations linked with previously identified CNVs. Hundreds polymorphism variations were identified by targeted DNA-seq in *cis*-promoter regions of detoxification genes. Among them, several were associated with the upper-regulation of detoxification enzymes in resistant populations. Finally, cross-comparing polymorphism data obtain from DNA-seq and RNA-seq allowed investigating allele specific expression (ASE) events related to PYR resistance. Overall, this study confirmed the benefits of combining transcriptomic and genomic NGS approaches for studying the molecular basis of insecticide resistance.

As a whole, this thesis not only contributed to better understand PYR resistance mechanisms in the dengue vector *Ae. aegypti* but also identified novel genomic markers of resistance opening the way for developing new molecular diagnostic to early detect and monitor resistance mechanisms in the field. This work also highlights the benefits of using NGS technologies for unravelling the molecular bases of adaptation in model organisms.